

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-507626

(43) 公表日 平成10年(1998) 7月28日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 9/127		A 6 1 K 9/127	M
35/76		35/76	
38/00	A C B	47/48	Z
38/21		48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平8-508477
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995) 8月25日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 2月26日
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 5 / 0 3 3 6 8
 (87) 国際公開番号 W O 9 6 / 0 6 9 3 8
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 3月7日
 (31) 優先権主張番号 9 4 1 7 3 6 6 . 3
 (32) 優先日 1994年 8月26日
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)
 (31) 優先権主張番号 9 5 0 6 4 6 6 . 3
 (32) 優先日 1995年 3月29日
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 ヘキスト、アクチェンゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、
 マイン (番地なし)
 (72) 発明者 ゼドラツェック、ハンスーハラルト
 ドイツ連邦共和国マールブルク、ゾンネン
 ハンク、3
 (72) 発明者 ミュラー、ロルフ
 ドイツ連邦共和国マールブルク、ポイティ
 ールスシュトラッセ、8
 (74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞サイクルによって変化する細胞に特異的な活性化化合物を用いる血管系の疾病の遺伝子療法

(57) 【要約】

血管系の疾病の遺伝子治療のためのDNA配列を記載する。DNA配列の本質的要素は、活性化配列、プロモーターモジュールおよび活性物質に対する遺伝子である。活性化配列は、細胞に特異的な方法で、平滑筋細胞、活性化された内皮細胞、活性化されたマクロファージまたは活性化されたリンパ球で活性化される。この活性化は、細胞サイクルに特異的な方法でプロモーターモジュールによって制御される。活性物質は、平滑筋細胞の成長および/または血液凝固のインヒビターである。記載されたDNA配列をウイルスまたは非ウイルスベクターに挿入し、このベクターに標識細胞に親和性を有するリガンドを補足する。

【特許請求の範囲】

1. 腫瘍症の予防または治療のための活性化化合物であって、活性化配列と、プロモーターモジュールと、抗腫瘍物質に対するDNA配列とからなるDNA構築物を含んでなる、活性化化合物。

2. プロモーターモジュールがCDE-CHR-Inr要素を有し、かつcdc25Cプロモーター領域（ヌクレオチド配列：GGCTGGCGGAAGGTTTGAATGGTCAACGCCCTGCGGCTGTTGATATTCTTG）の位置 $\leq -20 \sim \geq +30$ を含んでなるものであり、ここでCDEが細胞サ

イクル依存性要素（ヌクレオチド配列：TGGCGG）からなり、CHRが細胞サイクル遺伝子相同領域（ヌクレオチド配列：GTTTGA）からなり、Inrが開始部位（位置+1）および開始に重要な隣接配列からなるものである、請求の範囲第1項に記載の活性化化合物。

3. 内皮細胞または増殖する内皮細胞に直近の細胞で形成される転写因子によって制御される活性化配列を含んでなる、請求の範囲第1項に記載の活性化化合物。

4. CMVプロモーター、CMVエンハンサーまたはSV40プロモーター、または

内皮グルコース-1輸送体、エンドグリン、VEGFレセプター-1または-2、レセプターチロシンキナーゼ*ti1-1*または*ti1-2*、B61レセプター、B61リガンド、エンドセリン、特にエンドセリン-B、-1、マンノース-6-リン酸レセプター、IL-1 α またはIL-1 β 、IL-1レセプター、VCAM-1、von Willebrand因子、または

GATA-2のような内皮細胞で優先的または選択的に活性を有する転写因子のオリゴマー化した結合部位であって5'-TTATCT-3'である結合部位

からの合成活性化配列、または

VEGFについてのプロモーター配列、またはVEGFについてのエンハンサー配列、またはc-SRCまたはv-SRCについてのcDNA配列であって、

VEGF遺伝子を制御するもの、または

マウス哺乳動物腫瘍ウイルスのプロモーター配列またはステロイドレセプター
のプロモーター配列

を含んでなる、請求の範囲第3項に記載の活性化合物。

5. 抗腫瘍活性化合物のDNA配列が、

網膜芽細胞腫タンパク質p110またはp107、およびp130タンパク質
であり、または

p53タンパク質、または

p21タンパク質、P16タンパク質または別の「サイクリン依存性キナーゼ
(cdK)」インヒビター、または

GADD45タンパク質、または

bakタンパク質、または

脈管形成を阻害するタンパク質、または

細胞毒性作用を有するタンパク質、または

炎症を刺激するタンパク質、または

細胞成長抑制剤の前駆体を開裂して細胞成長抑制剤を形成する酵素

をコードするものである、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の活性化
合物。

6. 網膜芽細胞腫タンパク質(pRb/p110)が、246、350、6
01、605、780、786、787、800および804位のアミノ酸の置
換によりリン酸化することができず、しかしながら特にアミノ酸Thr-246
、Ser-601、Ser-605、Ser-780、Ser-786、Ser
-

787およびSer-800がAlaで置換されたもの、アミノ酸Thr-35
0がArgで置換されたものおよびSer-804がGluで置換されたものの
ように大型のT抗原との結合活性を喪失せず、または

p107タンパク質が、pRb/p110と同様の方法で突然変異され、また
は

P130タンパク質が、pRb/p110と同様の方法で突然変異されたものである、

請求の範囲第5項に記載の活性化合物。

7. タンパク質p53のDNA配列が、セリン392を除去することによってC末端が短縮されたものである、請求の範囲第5項に記載の活性化合物。

8. 抗腫瘍物質が、プラスミノゲン活性化合物インヒビター-1 (PAI-1)、PAI-2、PAI-3、アンギオスタチン、血小板因子4、TIMP-1、TIMP-2またはTIMP-3である、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の活性化合物。

9. 抗腫瘍物質がペルフォリン、グランチーム、IL-2、IL-4、IL-12、インターフェロン、例えばIFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TNF β 、オンコスタチンM、RANTES、MCAF、IL-8、MIP-1 α 、MIP-1 β 、NAP-2、IL-3、IL-5、LIF、IL-11またはIL-13である、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の活性化合物。

10. 抗腫瘍物質が免疫グロブリンのFc断片を有する融合タンパク質である、請求の範囲第9項に記載の活性化合物。

11. 抗腫瘍物質が酵素であり、この酵素が、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ、ニトロレダクターゼ、 β -グルクロニダーゼ（特に、ヒト、植物または細菌性 β -グルクロニダーゼ）、カルボキシペプチダーゼ、（好ましくは、シュドモナス由来

のもの）、ラクタマーゼ（好ましくは、*Bacillus cereus*由来のもの）、ピログルタメートアミノペプチダーゼ、D-アミノペプチダーゼ、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ヒドロキシニトリルリアーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼまたはグリコシダーゼである、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の活性化合物。

12. リソソーム保存が酵素のDNA配列の点突然変異によって減少され、細胞外分泌が増加された、請求の範囲第11項に記載の活性化合物。

13. 酵素のシグナル配列が相同性シグナル配列によって置換されて、細胞外分泌が向上された、請求の範囲第11項に記載の活性化合物。

14. 数個の同一または異なる抗腫瘍物質のDNA配列を含み、それぞれの場合に2個のDNA配列が内部リボソーム入口部位のDNA配列を介して互いに接続されてなる、請求の範囲第1～13項のいずれか1項に記載の活性化合物。

15. ベクターに挿入された、請求の範囲第1～13項のいずれか1項に記載の活性化合物。

16. ベクターがウイルスである、請求の範囲第15項に記載の活性化合物。

17. ウイルスがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、単純ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルスである、請求の範囲第16項に記載の活性化合物。

18. プラスミドに挿入された、請求の範囲第1～14項のいずれか1項に記載の活性化合物。

19. コロイド分散液系で調製される、請求の範囲第15～18項のいずれか1項に記載の活性化合物。

20. コロイド分散液系がリボソームである、請求の範囲第19項に記載の活性化合物。

21. コロイド分散液系がポリリシンリガンドである、請求の範囲第20項に記載の活性化合物。

22. 内皮細胞の膜構造に結合するリガンドによって補足された、請求の範囲第15～21項のいずれか1項に記載の活性化合物。

23. リガンドが、
ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはその抗体断片であって、その可変ドメインによって、内皮細胞の膜構造に結合し、または
サイトカインまたは成長因子、またはその断片または部分配列であって、平滑筋細胞上のレセプターに結合するものであるか、または

SLeX、LFA-1、MAC-1、LECAM-1またはVLA-4のよう

な付着分子である、

請求の範囲第22項に記載の活性化合物。

24. 内皮細胞の膜構造が、マンノースのレセプター、IL-1または成長因子、例えばPDGF、FGF、VEGF、TGF β である、請求の範囲第23項に記載の活性化合物。

25. 静脈内、動脈内または腹腔内注射、組織、組織裂への注射、または局所投与のための医薬製剤中の、請求の範囲第1～24項のいずれか1項に記載の活性化合物。

【発明の詳細な説明】

細胞サイクルによって変化する細胞に特異的な活性化化合物を用いる
血管系の疾病の遺伝子療法

技術分野

血管系の疾病の遺伝子治療のためのDNA配列が記載されている。DNA配列の本質的要素は、活性化配列、プロモーターモジュール、および活性物質に対する遺伝子である。活性化配列は、細胞に特異的な方法で、平滑筋細胞、活性化された内皮細胞、活性化されたマクロファージまたは活性化されたリンパ球で活性化される。この活性化は、細胞サイクルに特異的な方法でプロモーターモジュールによって制御される。活性物質は、平滑筋細胞の成長および／または血液凝固のインヒビターである。記載されたDNA配列をウイルスまたは非ウイルスベクターに挿入し、このベクターに標識細胞に親和性を有するリガンドを補足する。

1) 平滑筋細胞による血管の疾患

血管系の平滑筋細胞は、主として動脈中膜に局在しており、局所的および全身の血圧制御に関与している。損傷のない健康な血管では、これらの平滑筋細胞は細胞分裂の静止状態にある(R. Rose, Nature 362, 801(1993))。血管系が創傷を受けると、平滑筋細胞が血管壁の内膜層に移動して、そこで増殖し(新内膜形成(neointima formation))、細胞外マトリックス成分を形成する。

平滑筋細胞の内膜増殖は、動脈硬化症の始まりにおける本質的要因と考えられている(J.S. Forrester et al., Am. Coll. Cardiol. 17, 758(1991))。また、この平滑筋細胞の増殖により、血管形成手術の後および狭窄した血管のバルーン拡張の後に血管の再狭窄を引き起こす(R.S. Schwartz et al., Am. Coll.

Cardiol. 29, 1284(1992), M.W. Lie et al., Circulation 79, 1374(1989))。

知られているように、動脈硬化症並びに血管の狭窄症および再狭窄症により、最後には血管の血栓症を引き起こし、これにより生命を危険に陥れる梗塞を引き起こすことがしばしばある。

しかしながら、今日までのところ、平滑筋の成長を抑制することによる血管の狭窄症を防止するのに有効な治療法は未だない。実際に、ヘパリンは平滑筋細胞

の増殖を抑制することができることが知られているが(Cochran et al., J. Cell Physiol. 124, 29(1995)、ヘパリンを使用すると、狭窄の形成を適度に防止することはできない。損傷を受けた血管での平滑筋細胞の成長を防止することによる心筋梗塞の危険性を除去する新規な方法が試験されたことは明白なことであった。この方法では、平滑筋細胞の成長を制御的に防止する遺伝子および分子の知識が用いられた。

このように、プロト腫瘍遺伝子(protooncogene) *c-myc* および *cdc2* -キナーゼおよび「増殖細胞核抗原(PCNA)」が平滑筋細胞の増殖に関与していることが知られている。血管損傷の直後に、その部位に局所的にアンチセンス *c-myc* オリゴヌクレオチド(Simons et al., Nature 359, 67(1992))並びにアンチセンス *cdc2* -キナーゼオリゴヌクレオチドをアンチセンスPCNAオリゴヌクレオチド(Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 8474(1993))と組合せて投与することによって、ラットの平滑筋細胞の増殖を防止することができた。

同様な結果は、ネズミおよびブタにおいて、この場合にも血管の損傷の直後にその部位に局所的に、腫瘍遺伝子サプレッサーとして知られている網膜芽腫(Rb)遺伝子を投与することによって得られた。Rb遺伝子生成物のリン酸化による不活性化を防止するため、Rbタンパク質のリン酸化が可能でない本質的に活性な形態をコードする点突然変異したRb遺伝子を用いた(Thr-246、Ser-

601、Ser-605、Ser-780、Ser-786、Ser-787、Ser-800をAlaで置換し、Thr-350をArgで置換し、Ser-804をGluで置換したもの(Hamel et al., Mol. Cell Biol. 12, 3431(1992))。この突然変異したRb遺伝子を、複製不全組換えアデノウイルスに組み込み、このベクターを局所投与した(Chang et al., Science 267, 518(1995))。

もう一つの実験的試みでは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(AV-*HSV-TK*)に対する遺伝子を挿入した複製不全組換えアデノウイルスを用いた。このキナーゼ遺伝子生成物は活性化化合物前駆体(「プロドラッグ」)であるガンシクロビルをリン酸化することにより、これをDNA合成を阻害するヌクレオ

シド類似体に転換することができる。

遺伝子ベクターA V-H S-T Kを、管損傷を受けてから7日後に投与したが、ここでは損傷の部位に余りに局所的に投与したので、続いてガンシクロビルを14日間に亘って毎日腹腔内に投与した。この処理によって、ラットでは平滑筋細胞の成長が顕著に抑制された(Guzman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 10732(1994))。同じ種類の処理を用いると、ブタでも同様な結果が得られた(Ohno et al., Science 265, 781(1994))。しかしながら、ここではベクターの投与を血管に損傷を受けた直後に行い、ガンシクロビルを6日間毎日投与した。

これらの実験は、平滑筋細胞の細胞分裂過程を妨害する様々な遺伝子療法による手段によって、血管の損傷の後に狭窄症を防止することができることを明確に示している。

しかしながら、文献から知られているこれらの方法の不利な点は、活性物質(ベクター)を血管の損傷の部位に局所的に適用しなければならず、必要ならば、血管の関連部分を時々閉じて、ベクターが洗い流されてしまうのを防止しなければならないことである。このような方法が、狭窄を引き起こした血管のバルーン

拡張の過程で実際に日常的に行われているが、かなりの努力が必要であり、またこれらに関しては血栓症や塞栓症の危険により患者をかなり危険に晒すことになる。

一方、ベクターを局所的に投与するにも拘らず、それらは増殖平滑筋細胞だけに導入されるとは限らない。他の近接したまたは沿革の細胞に導入されると、専門家で今日論議されているような副作用(特に、細胞の形質転換および腫瘍の誘発)を引き起こす可能性がある(Friedmann, Science 244, 1275(1989), Plummer, Scrip Magazine III/29(1995))。

上記のベクターの投与に代わるものとして、平滑筋細胞の増殖の抑制を目的とする細胞成長抑制剤の全身的(例えば、静脈内または経口)投与では、血管の疾患の部位に僅かな一過性の効果しかないが、他方、内皮を損傷する危険がありかつ著しい急性および慢性の副作用が生じる。

2) 血栓症

血栓症は治療が次第に困難になり、場合によっては動脈硬化症、動脈および静脈疾患、および局所性および全身性の免疫反応症候群のような代謝疾患の生命を脅かす合併症となる(Philipps et al., Blood 71, 831(1988), Harker, Biomed. Progr. 8, 17 (1995) の総説)。

多数の抗凝固薬、抗血栓薬、フィブリン溶解剤、および血小板凝固阻害薬が比較的長期間臨床的に使用されてきており、また新規物質が臨床試験に掛けられているが、血栓症の生命に関わる合併症は今日までのところ防止することもまたは適当な程度まで制御することもできない(White, Scrip Magazine 4, 6(1994), Antiplatelet Trialist's Collaboration BMJ 308, 81(1994))。

従って、血栓症の防止および治療のための新規医薬品が強く望まれている(BMJ 305, 567(1992), Vinazzer, Biomedical Progress 6, 17(1993))。血栓症のかなりの部分は、活性化したまたは損傷を受けた内皮細胞にその原因がある。こ

れらの細胞自体、または血中で、これら自身または活性化したマクロファージ、リンパ球、血小板および顆粒球と共に、成長因子によって刺激されて増殖を開始した平滑筋細胞により、血栓系の活性化が起こる(Nemerson, Blood 71,1(1988))。

この活性化により、最終的にはフィブリンが形成され、血小板が活性化されて凝集し、フィブリンの多いまたは血小板の多い血管を圧縮または閉塞する血栓が形成され、血栓症を引き起こす。動脈血管系の領域でのこの種の血栓症が、例えば心臓または脳では生命に関わる梗塞を引き起こす。

抗血栓薬(例えば、ヘパリンまたはヘパリンの画分)、抗凝固薬(例えば、クマリン)、血小板凝集阻害薬(例えば、アスピリン)およびフィブリン溶解薬(例えば、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼまたは組織プラスミノゲン活性化剤(t p A))を用いる今日までに確立された療法は、生命に関わる血栓症の予防作用および多くの臨床的研究によって明らかにされている存在する血栓に対する治療作用を実際に引き起こすが、この作用は不適當である。この理由は、かなりの程度まで、用いる治療薬の作用が疾患すなわち血栓の部位に限定されず、全身に作用するという事実によるものである。従って、これによって引き起こされる

出血により、投与量および投与期間の増加が限定される。

3) 発明の一般的説明

本発明は、患者に局所または全身投与することができ、

主として、細胞分裂の過程にある平滑筋細胞だけに作用して、血管傷害または血管損傷の後に平滑筋細胞の増殖を抑制することによって、血管の狭窄または再狭窄を防止し、

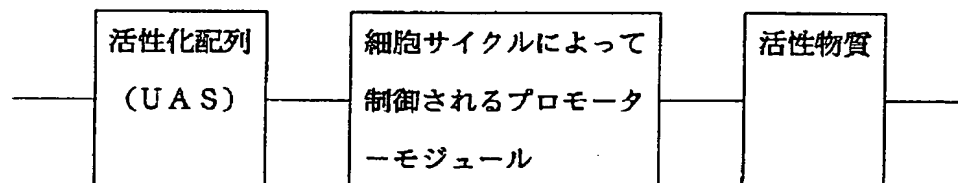
主として、生成する血栓の部位、すなわち活性化しおよび増殖する内皮細胞、内膜の平滑筋細胞、マクロファージおよび／またはリンパ球の部位だけで血栓を抑制し、または

平滑筋細胞の増殖を抑制し、かつその部分の血栓を局所的に抑制する

活性化化合物（すなわち、医薬品）に関する。

この活性化化合物の主要成分は、下記の組成からなるDNA構築物である。

（DNAは、本出願明細書の全文において、相補性DNA（cDNA）およびゲノムDNA配列の両方に対する共通用語として用いられる。）



この活性化化合物の主要要素は、細胞サイクルによって制御されるプロモーターモジュールである。

細胞サイクルによって制御されるプロモーターモジュールは、例えばヌクレオチド配列－CDE－CHR－Inr－である（下記を参照されたい）。このプロモーターモジュールの重要な機能は、細胞サイクルのG0／G1相における活性化配列の機能の抑制、およびS／G2相において、従って増殖細胞における細胞サイクルに特異的な発現である。

プロモーターモジュールCDE－CHR－Inr－は、ヒトcdc25CプロモーターのG2－特異性発現の詳細な研究の過程で発見された。出発点は、細胞サイクルのG1相におけるプロモーターの遮断に関与するリプレッサー要素（細

胞サイクル依存性要素；CDE)を見いだしたことであった(Lucibello et al., EMBO J. 14, 132(1995))。ゲノムジメチル硫酸フットプリント法および機能分析法(functional analyses)(第1および2図)を用いて、CDEはG1に特異的にリプレッサー(CDE結合因子；CDF)に結合することによって非増殖(G0)細胞での転写が抑制されることを示した。基底プロモーター(basal promoter)の領域に局在化されているCDEは、その抑制機能において、「上流の活性化配列」(UAS)によって変化する。これにより、CDE結合因子は、細胞サイクル依存的に、すなわち非増殖細胞および細胞サイクルのG1相

において、5'に結合した活性化物質タンパク質の転写活性化作用を阻害するという結論が得られた(第3図)。

この結論を更に実験によって確かめたのであり、ウイルス性の非細胞サイクル制御初期SV40エンハンサーをcdc25最小プロモーター(minimum promoter)(CDEおよび3'位の開始部位からなる)と融合することによって、キメラプロモーターの細胞サイクルが明確に制御された(第4図)。次に、cdc25Cエンハンサーについて検討したところ、細胞サイクル依存的にCDFによって制御される転写因子は、NF-Y(CBF)(Dorn et al., Cell 50, 863(1987), van Hijisduijnen et al., EMBO J. 9, 3119(1990), Coustry et al., J. Biol. Chem. 270, 468(1995))、Sp1(Kadonagaら, TIBS 11, 10(1986))、および新規である可能性があるCBS7に結合する転写因子であることが明らかになった。この研究において得られたもう一つの興味ある知見は、cdc25Cエンハンサー内のNF-Yのみが、少なくとも1種類の他のNF-Y複合体またはCIFと協同して効率的に転写を活性化することが見られたことである。NF-YもSp1も両方ともグルタミン含量の高い活性化物質のクラスに属し、抑制の機構(例えば、特定の基底転写因子またはTAFとの相互作用または干渉)に対する重要な情報を提供する。

cdc25C、サイクリンAおよびcdc2のプロモーター配列を比較したところ、多くの領域で相同性が見られた(第5図)。CDEが3種類のプロモーター(含まれている多様性は機能上関連はない)総てに保存されてだけでなく、隣

接Y_cボックスも保存されている。予想されるように、これらの領域は総てイン・ビボでタンパク質結合を示し、CDEの場合には細胞サイクル依存性であった。更に、3種類のプロモーターは総て、CDEの突然変異によって制御解除されることも示された(第1表)。cdc25C、サイクリンAおよびcdc2配列を比較したところ、直ちにCDEの3'の領域に著しい類似性のあることも明らか

になった(細胞サイクル遺伝子相同領域; CHR)(第5図)。この領域は機能上はCDEと同様に重要であるが(第1表)、それはイン・ビボでのDMSフットプリント法の実験では明らかではない。これに対する可能な説明は、この因子とDNAの小さな溝(minor grooves)との相互作用である。電気泳動移動度シフト分析(EMSA)実験の結果は、CDEとCHRとは一緒にタンパク質複合体であるCDFに結合することを示している。これらの観察は、グルタミン含量の高い活性化物質のCDFによって媒介される抑制は、細胞サイクルによって制御される転写において頻繁に起きる機構であることを示している。

しかしながら、cdc25Cプロモーターを制御するのに重要なものは、CDE-CHR領域だけでなく、基底プロモーターのヌクレオチド配列(位置 $\leq -20 \sim \geq +30$ 、第1図を参照されたい)内の開始部位(位置+1)の一つでもあ

る。転写因子YY-1のイン・ビトロでの結合部位を含むこの領域での突然変異(SetoおよびShenk, Nature354, 241(1991), UshevaおよびShenk, Cell 76, 1115 (1994))により、完全に制御解除される。CDE-CHRが基底プロモーターに近接していることを考慮すれば、CDFは基底転写複合体と相互作用すると思われる。

活性化配列(UAS=上流活性化配列)は、転写因子を用いて形成されまたは標的細胞において積極的に相互作用するヌクレオチド配列(プロモーター配列またはエンハンサー配列)であると理解すべきである。用いられる活性化配列は、CMVエンハンサー、CMVプロモーター((EP 0173, 177, B1)、SV40プロモーター、または当業者に知られている任意の他のプロモーター

またはエンハンサー配列であることができる。しかしながら、本発明においては、好ましい活性化配列としては、特に平滑筋細胞、活性化した内皮細胞、または活性化したマクロファージまたはリンパ球で形成されるタンパク質をコードする遺伝子由来の遺伝子制御配列または要素が挙げられる。

活性物質は、由来の部位において、治療効果、すなわち平滑筋細胞の増殖、血栓または（2種類の活性物質の場合には）両方の抑制をもたらすタンパク質についてのDNAであると理解すべきである。活性化配列および活性物質に対するヌクレオチド配列の選択は、標的細胞および所望な活性物質によって変化する。本発明によるDNA構築物を当業者に慣用されている方法で構成して、ベクターとし、例えばこれをウイルスベクターに挿入し（これに関しては、D. Jolly, *Cancer Gene Therapy* 1, 51(1994)）、或いは補足してプラスミドを得る。ウイルスベクターまたはプラスミドは、コロイド分散液、例えばリポソーム(Farhood et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* 716, 23(1994))またはポリリシン/リガンド抱合体(Curiel et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* 716, 36(1994))と複合体を形成することができる。医薬の調製も、同様に通常の薬学助剤を用いて行うことができる。

この種のウイルス性または非ウイルス性ベクターに、選択された標的細胞上の膜構造に結合親和性を有するリガンドを補足することができる。従って、リガンドの選択は、標的細胞の選択によって変化する（本明細書、4.4以後、および5.4以後を参照されたい）。本発明による活性化化合物を、下記の例によって更に詳細に説明する。

4) 平滑筋細胞の増殖の抑制のための活性化化合物

4.1. 平滑筋細胞のための活性化配列の選択

本発明において用いられる活性化配列は、特に平滑筋細胞中で形成したタンパク質をコードする遺伝子由来の遺伝子制御配列または要素であるのが好ましい。これらの遺伝子は、例えば下記のようなものである。

トロポミオシン

(Tsukahara et al., *Nucleic Acid Res.* 22, 2318(1994), Novy et al.,

Cell Motility and the Cytoskeleton 25, 267(1993), Wilton et al.,

Cytogenetics and Cell Genetics 68, 122(1995))

α -アクチン

(Sartorelli et al., Gens and Developm. 4, 1811(1990), Miwa et al.,
Nucleic Acids Res. 18, 4263(1990))

α -ミオシン

(Kelly et al., Can. J. Physiol. and Pharm. 72, 1351(1994), Moussavi et al., Mol. Cell. Biochem. 128, 219(1993))

成長因子のレセプター、例えばPDGF、FGF

(Rubin et al., Int. Congress Ser. 925, 131(1990), Ross, Ann. Rev. Med. 38, 71(1987))

アセチルコリンのレセプター

(Dutton et al., PNAS USA 90, 2040(1993), Durr et al., Eur. J. Biochem. 224, 353(1994))

ホスホフルクトキナーゼ-A

Gekakis et al., Biochemistry 33, 1771(1994), Tsujino et al., J. Biol. Chem. 264, 15334(1989), Castilla-Escola et al., Gene 91, 225(1990))

ホスホグリセレートムターゼ

(Nakatsuji et al., Mol. Cell Biol. 12, 4384(1992))

トロポニンC

(Lin et al., Mol. Cell Biol. 11, 267(1991))

デスミン

(Li et al., J. Biol. Chem. 266, 6562(1991), Neuromuscular Disorders 3, 423(1993))

ミオゲニン

(Funk et al., PNAS USA 89, 9484(1992), Olson, Symp. Soc. Exp. Biol. 46, 331(1992), Zhon et al., Mol. Cell. Biol. 14, 6232(1994), Atchley et

t al., PNAS USA 91, 11522(1994))

エンドセリンAのレセプター

(Hosoda et al., J. Biol. Chem. 267, 18797(1992), Oreilly et al., J. Cardiovasc. Pharm. 22, 18(1993), Hayzer et al., Am. J. Med. Sci. 304, 231(1992), Haendler et al., J. Cardiovasc. Pharm. 20, 1(1992))

V E G F

V E G F は、特に低酸素条件下で平滑筋細胞によって形成される (Berse et al., Mol. Biol. Cell 3, 211(1992), Finkenzeller et al., BBRC 208, 432(1995), Tischer et al., BBRC 165, 1198(1989), Leung et al., Science 246, 1306(1989), Ferrara et al., Endoc. Rev. 13, 18(1992))。

これらのタンパク質に対する遺伝子のプロモーター配列は、下記の研究によって得ることができる。

トロポミオシン

(Gooding et al., Embo J. 13 3861(1994))

α -アクチン

(Shimizu et al., J. Biol. Chem. 270, 7631(1995), Sartorelli et al., Genes Dev. 4, 1811(1999))

α -ミオシン

(Kurabayashi et al., J. Biol. Chem. 265, 19271(1990), Molkentin et al., Mol. Cell. Biol. 14, 4947(1994))

P D G F のレセプター

(Pistritto et al., Antibiot. Chemother. 46, 73(1994))

F G F のレセプター

(Myers et al., J. Biol. Chem. 270, 8257(1995), Johnson et al., Adv. Cancer Res. 60, 1(1993), Chellaiah et al., J. Biol. Chem. 269, 11620(1994), Yu et al., Hum. Mol. Genetics 3, 212(1994), Wang et al., BBRC 203, 1781(1994), Murgue et al., Cancer Res. 54, 5206(1994), Avraham et al., Genomics 21, 656(1994), Burgess et al., Ann. Rev. Biochem. 58, 575(1989)

))

M R F - 4

(Naidu et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2707(1995))

ホスホフルクトキナーゼ A

(Gekakis et al., Biochem. 33, 1771(1994))

ホスホグリセレートムターゼ

(Makatsuji et al., Mol. Cell Biol. 12, 4384(1992))

トロポニン C

(Ip et al., Mol. Cell. Biol. 14, 7517(1994), Parmacek et al., Mol. Cell. Biol. 12, 1967(1992))

ミオゲニン

(Salminen et al., J. Cell Biol. 115, 905(1991), Durr et al., Eur. J. Biochem. 224, 353(1994), Edmondson et al., Mol. Cell. Biol. 12, 3665(1992))

エンドセリン A のレセプター

(Hosoda et al., J. Biol. Chem. 267, 18797(1992), Li and Paulia, J. Biol. Chem. 266, 6562(1991))

デスミン

(Li et al., Neuromusc. Dis. 3, 423(1993), Li and Capetanaki, Nucleic Acids Res. 21, 335(1993))

V E G F

V E G F 遺伝子の遺伝子制御配列は、下記の通りである。

* V E G F 遺伝子のプロモーター配列 (5' - 隣接領域)

(Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35(1994), Tischer et al., J. Biol. Chem. 266, 11947(1991))、または

* V E G F 遺伝子のエンハンサー配列 (3' - 隣接領域)

(Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35(1994)、または

* c - S r c 遺伝子

(Mukhopadhyay et al., Nature 375, 577(1995), Bonham et al., Oncogene 8, 1973(1993), Parker et al., Mol. Cell. Biol. 5, 831(1985), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122(1985)、または

・ V-Src 遺伝子

(Mukhopadhyay et al., Nature 375, 577(1995), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122(1985), Gibbs et al., J. Virol. 53, 19(1985))

・ 「人工」プロモーター

ヘリックスループヘリックス (HLH) 類の因子 (MyoD、Myf-5、ミオゲニン、MRF4 (Olson and Klein, Genes Dev. 8, 1(1994)の総説) は、筋肉に特異的な転写活性化物質として記載されている。また、筋肉に特異的な転写活性化物質としては、ジンク・フィンガー・タンパク質 (zinc finger protein) GATA-4 (Arcece et al., Mol. Cell. Biol. 13, 2235(1993); Ip et al., Mol. Cell. Biol. 14,

7517(1994))およびMEF-2転写因子群 (Yu et al., Gene Dev. 6, 1783(1992))が挙げられる。

HLHタンパク質およびGATA-4は、筋肉に特異的な遺伝子のプロモーターを用いてだけでなく、非相同性の状況においても、すなわち人工プロモーターを用いても、筋肉に特異的な転写を示す。この主の人工プロモーターは、例えば下記のようなものである。

・ 筋肉に特異的なHLHタンパク質の (DNA) 結合部位の多重コピー

例えばEボックス (MyoD)

(例えば、4×AGCAGGTGTTGGGAGGC)

(Weintraub et al., PNAS 87, 5623(1990))

・ α-ミオシン重鎖遺伝子のGATA-4のDNA結合部位の多重コピー

(例えば、5'-GGCCGATGGGCAGATAGAGGGGGCCGATGGGCAGATAGAGG-3')

(Molkentin et al., Mol. Cell. Biol. 14, 4947(1994))

4.2. 平滑筋細胞に対する活性物質の選択

本発明において活性物質は、DNA配列であって、その発現タンパク質が平滑筋細胞の増殖を抑制するものを意味すると理解すべきである。これらの細胞サイクルインヒビターとしては、例えば下記のタンパク質に対するDNA配列が挙げられる。

a) 阻害タンパク質

網膜芽細胞腫タンパク質 (p R b = p 1 1 0) または関連の p 1 0 7 および p 1 3 0 タンパク質 (La Thangue, Curr. Opin. Cell Biol. 6, 443(1994))

p 5 3 タンパク質 (Prives et al., Genes Dev. 7, 529(1993))、

p 2 (W A F - 1) タンパク質 (El-Deiry et al., Cell 75, 817(1993))、

p 1 6 タンパク質 (Serrano et al., Nature 366, 704(1993), Kamb et al., Science 264, 436(1994), Nobori et al., Nature 368, 753(1994))、

他の c d K インヒビター (Pines, TIBS 19, 143(1995)の総説)、

G A D D 4 5 タンパク質 (Papathanasiou et al., Mol. Cell. Biol. 11, 1009(1991), Smith et al., Science 266, 1376(1994))、

b a k タンパク質 (Farrow et al., Nature 374, 731(1995), Chittenden et al., Nature 374, 733(1995), Kiefer et al., Nature 374, 736(1995))。

これらの細胞サイクルインヒビターの細胞内で速やかに不活性化されるのを防止するには、発現したタンパク質の不活性化部位に突然変異を有し、それによってこれらのタンパク質機能は損なわれない遺伝子を用いるのが好ましい。

網膜芽細胞腫タンパク質 (p R b / p 1 1 0) および関連の p 1 0 7 および p 1 3 0 タンパク質は、リン酸化によって不活性化される。従って、p R b / p 1 1 0、p 1 0 7 または p 1 3 0 c D N A 配列であって、コードしたタンパク質のリン酸化部位をリン酸化することができないアミノ酸で置換する方法で突然変異したものを用いるのが好ましい。

Hamel et al. (Mol. Cell Biol. 12, 3431(1992))によれば、網膜芽細胞腫タンパク質 (p110) のcDNA配列は、246、350、601、605、780、786、787、800および804位のアミノ酸が置換されているため、リン酸化することができないが、ラージT抗原とのその結合活性は損なわれない。例えば、アミノ酸Thr-246、Ser-

601、Ser-605、Ser-780、Ser-786、Ser-787およびSer-800はAlaで置換され、アミノ酸Thr-350はArgで、アミノ酸Ser-804はGluで置換される。

p107タンパク質またはp130タンパク質のDNA配列も、同様に突然変異される。

タンパク質p53は、細胞においてMDM2のような特異性タンパク質に結合することによって、または脱リン酸化したC-末端セリン392によってp53をオリゴマー化することによって不活性化される (Schikawa et al., Leukemia and Lymphoma 11, 21(1993)およびBrown, Annals of Oncology 4, 623(1993))。従って、セリン392によってC-末端で短縮されたp53タンパク質のDNA配列を用いるのが好ましい。

b) 細胞成長抑制性または細胞毒性タンパク質

活性物質は、細胞成長抑制性または細胞毒性タンパク質を発現するDNA配列を意味するものとしても理解すべきである。

この種のタンパク質としては、例えば下記のものが挙げられる。

ペルホリン(perforin)(Lin et al., Immunol. Today 16, 194(1995))、
グランチーム(granzyme)(Smyth et al., Immunol. Today 16, 202(1995))、

TNF (Porter, TibTech 9, 158 Sidhu et al., Pharmc. Ther. 57, 79 (1993))、特に

・TNF α (Beutler et al., Nature 320, 584(1986), Kriegler et al., Cell 53, 45(1988))、

・TNF β (Gray et al., Nature 312, 721(1984), Li et al., J. Im

munol. 138, 4496(1987), Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260, 2334(1985)

。

c) 酵素

しかしながら、活性物質は、細胞成長抑制剤の不活性前駆体を細胞成長抑制剤に転換する酵素のDNA配列を意味するものとも理解すべきである。

不活性な予備物質（プロドラッグ）を開裂して活性な細胞成長抑制剤（薬物）とするこの種の酵素、およびそれぞれの場合における適当なプロドラッグおよび薬物は、既にDeonarain et al., Br. J. Cancer 70, 786(1994)、およびMullen, Pharmac. Ther. 63, 199(1994)およびHarris et al., Gene Ther. 1, 170(1994))によって明確に記載されている。

例えば、下記の酵素の一つのDNA配列を用いることができる。

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ

(Garapín et al., PNAS USA 76, 3755(1979), Vile et al., Cancer Res. 53, 3860(1993), Wagner et al., PNAS USA 78, 1441(1981), Moelten et al., Cancer Res. 46, 5276(1986), J. Natl. Cancer Inst. 82, 297(1990)),

帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ

(Huber et al., PNAS USA 88, 8039(1991), Snoeck, Int. J. Antimicrob. Agents 4, 211(1994)),

細菌性ニトロレダクターゼ

(Michael et al., FEMS Microbiol. Letters 124, 195(1994), Bryant et al., J. Biol. Chem. 266, 4126(1991), Watanabe et al., Nucleic Acids Res. 18, 1059(1990)),

細菌性 β -グルクロニダーゼ

(Jefferson et al., PNAS USA 83, 8447(1986)),

Secale cereale由来の植物性 β -グルクロニダーゼ

(Schulz et al., Phytochemistry 26, 933(1987)),

ヒト β -グルクロニダーゼ

(Bosslet et al., Br. J. Cancer 65, 234(1992), Oshima et al., PNAS USA 84, 685(1987)),

ヒトカルボキシペプチダーゼ(CB)、例えば

* 肥満細胞CB-A

(Reynolds et al., J. Clin. Invest. 89, 273(1992)),

* 脾臓CB-B

(Yamamoto et al., J. Biol. Chem. 267, 2575(1992), Catasus et al., J. Biol. Chem. 270, 6651(1995)),

細菌性カルボキシペプチダーゼ

(Hamilton et al., J. Bacteriol. 174, 1626(1992), Osterman et al., J. Protein Chem. 11, 561(1992)),

細菌性 β -ラクタマーゼ

(Rodrigues et al., Cancer Res. 55, 63(1995), Hussain et al., J. Bacteriol. 164, 223(1985), Conque et al., Embo J. 12, 631(1993)),

細菌性シトシンデアミナーゼ

(Mullen et al., PNAS USA 89, 33(1992), Austin et al., Mol. Pharmacol. 43, 380(1993), Danielson et al., Mol. Microbiol. 6, 1335(1992)),

ヒトカタラーゼまたはペルオキシダーゼ

(Ezurum et al., Nucl. Acids Res. 21, 1607(1993)),

ホスファターゼ、特に

ヒトアルカリホスファターゼ

* ヒトアルカリホスファターゼ

(Gum et al., Cancer Res. 50, 1085(1990)),

* ヒト酸性前立腺ホスファターゼ

(Sharieff et al., Am. J. Hum. Gen. 49, 412(1991), Song et al., Gene 129, 291(1993), Taylor et al., Nucl. Acids Res. 18, 4928(1990)),

* 5型酸性ホスファターゼ

(Gene 130, 201(1993)),

オキシダーゼ、特に

・ヒトリシルオキシダーゼ

(Kimi et al., J. Biol. Chem. 270, 7176(1995))、

・ヒト酸性D-アミノオキシダーゼ

(Fukui et al., J. Biol. Chem. 267, 18631(1992))、

ペルオキシダーゼ、特に

・ヒトグルタチオンペルオキシダーゼ

(Chada et al., Genomics 6, 268(1990), Ishida et al., Nucl. Acids Res. 15, 10051(1987))、

・ヒト好酸性ペルオキシダーゼ

(Ten et al., J. Exp. Med. 169, 1757(1989), Sahamaki et al., J. Biol. Chem. 264, 16828(1989))、

・ヒトチロイドペルオキシダーゼ

(Kimura, PNAS USA 84, 5555(1987))。

引用した酵素の分泌を促進するため、それぞれの場合にDNA配列に含まれる相同シグナル配列を、細胞外分泌を改良する非相同シグナル配列に代えることができる。

従って、 β -グルクロニダーゼのシグナル配列 (DNA位置 $\leq 27 \sim 93$; Oshima et al., PNAS 84, 685(1987)) を、例えばヒト免疫グロブリン

のシグナル振幅 (DNA位置 $\leq 63 \sim \geq 107$; Riechmann et al., Nature 332, 323(1988)) に代えることができる。

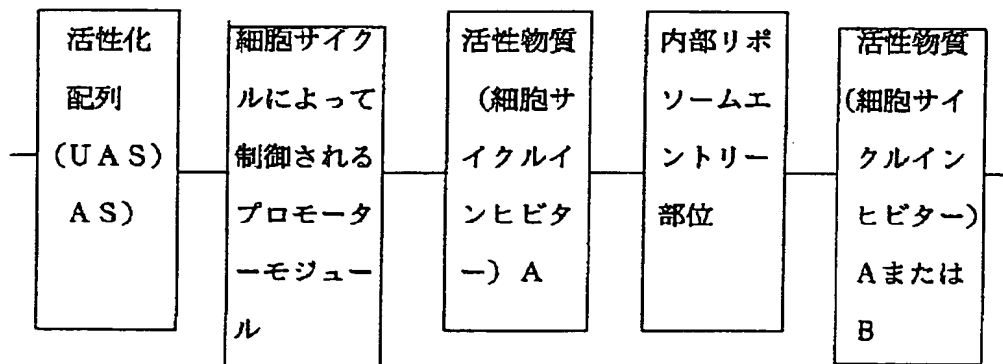
また、点突然変異により、リソソームでは比較的低い程度に保存される酵素のDNAを選択する方が好ましい。この種の点突然変異は、例えば β -グルクロニダーゼについて記載されている (Shipley et al., J. Biol. Chem. 268, 12193(1993))。

4.3. 平滑筋に対する同一または異なる活性物質の組合せ

本発明は、活性化化合物であって、幾つかの同一な活性物質 (A, A) または異なる活性物質 (A, B) のDNA配列の組合せが含まれているものにも関する。

2個のDNA配列を発現させるには、「内部リボソームエントリー部位 (IRES)」のcDNAを制御要素として挿入するのが好ましい。この種のIRESは、MountfordおよびSmith (TIG 11, 179 (1995)、Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485(1991)、Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992)、およびDirks et al., Gene 129, 247(1993)、PelletierおよびSonenberg, Nature 334, 320(1988)、Sugimoto et al., BioTech. 12, 694(1994)によって記載されている。

従って、ポリオウイルスのIRS配列のcDNA (5' UTRの位置 ≤ 140 $\sim \geq 630$ (Pelletier and Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)))を用いて、抗血栓物質A (3' 末端)のDNAと抗血栓物質B (5' 末端)とを連結することができる。



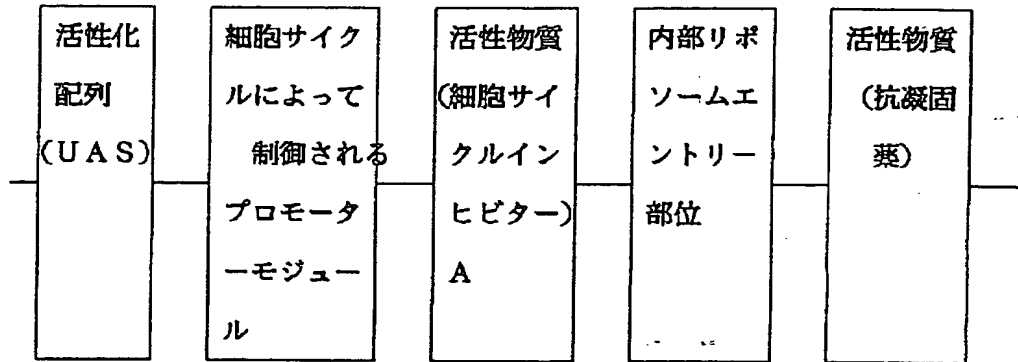
この種の活性化化合物は、組み合わせによって、本発明の意味において相加的または相乗的效果を示す。

平滑筋細胞の内膜成長の結果として、また細胞サイクルインヒビターの作用の結果としてのアポプトーシスまたは壊死により、血栓系が活性化され血栓症が起こることがある。この種の血栓症は、抗凝固薬 (アスピリン、ヘパリン、または別の抗血栓薬) を予防的に投与することによって防止することができる。この抗凝固薬は、全身的に、すなわち経口または非経口的に投与される。

しかしながら、抗凝固薬の副作用により、平滑筋細胞の内膜成長の部位で適当な濃度となるのが妨げられることがしばしばある。

従って、この種の抗凝固薬による血栓症の予防は、安全性に欠けるものである (Pukac, Am. J. Pathol. 139, 1501(1991))。

本発明のもう一つの課題は、本発明の意味において請求の範囲に記載の活性化化合物が、細胞サイクリンヒビターである活性物質に加えてもう一つの要素として、抗凝固薬である活性物質に対するDNA配列を含むことである。



抗凝固薬の発現は、細胞サイクリンヒビターの発現と同様に、活性化配列および細胞サイクルによって制御されるリプレッサーモジュールによって制御される。細胞サイクリンヒビターおよび抗凝固薬の同時発現は、「内部リボソームエントリー部位」(IRES)遺伝子要素によって制御するのが好ましい。用いる抗凝固薬は、例えばプラスミノゲン活性化物質(PA)、すなわち組織P

A(tPA)またはウロキナーゼ様PA(uPA)、タンパク質C、抗トロンビン-III、組織因子経路インヒビターまたはヒルジンに対する遺伝子である。これらの抗凝固薬に対するDNA配列を、下記に記載する。

組織プラスミノゲン活性化物質(tPA)

(Sasaki et al., Nucl. Acids Res. 16, 5695(1988), Penica et al., Nature 301, 214(1983), Wei et al., DNA 4, 76(1985), Harries et al., Mol. Biol. Med. 3, 279(1986))

ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化物質(uPA)

(Miyake et al., J. Biochem. 104, 643(1988), Nelles et al., J. Biol. Chem. 262, 5682(1987))

tPAおよびuPAのハイブリッド

(Kalyan et al., Gene 68, 205(1988), Devries et al., Biochem. 27, 2565(1988))

タンパク質C

(Foster et al., PNAS 82, 4673(1985))

ヒルジン

(Maerki et al., Semin. Thromb. Hemostas. 17, 88(1991), De Taxis du P
oet et al., Blood Coag. Fibrin. 2, 113(1991), Harvey et al., PNAS USA 83
, 1084(1986), Sachhieri et al., EP 0324 712 B1, EP 0142 860 B1)

セリンプロテイナーゼインヒビター (セルピン)、例えば

・C-1 S インヒビター

(Bock et al., Biochem. 25, 4292(1986), Davis et al., PNAS USA 83, 3
161(1986), Que, BBRC 137, 620(1986), Rauth et al., Proteine Sequences an
d Data Analysis 1, 251(1988), Carter et al., Eur. J. Bi

ochem. 173, 163(1988), Tosi et al., Gene 42, 265(1986), Carter et al., E
ur. J. Biochem. 197, 301/1991), Eldering et al., J. Bio. Chem. 267, 7013
(1993))

・ α 1-抗トリプシン

(Tosi et al., Gene 42, 265(1986), Graham et al., Hum. Genetics 85,
381(1990), Hafeez et al., J. Clin. Invest. 89, 1214(1992), Tikunova et a
l., Bioorganicheskaja Khimia 17, 1694(1991), Kay et al., Human Gene Ther
. 3, 641(1992), Lemarchand et al., Molekulaiaruaia Biologica 27, 1014(19
93)), Lambach et al., Human Mol. Gen. 2, 1001(1993))

・抗トロンビンIII

(Stackhouse et al., J. Biol. Chem. 258, 703(1983), Olds et al., Bio
chem. 32, 4216(1993), Laue et al., Nucl. Acids Res. 22, 3556(1994))

組織因子経路インヒビター (TFPI)

(Enjyoji et al., Genomics 17, 423(1993), Wun et al., J. Biol. Chem.
263, 6001(1988), Girard et al., Thromb. Res. 55, 37(1989))

4.4. 平滑筋細胞に対するリガンドの選択 (上記9頁、5～21行目を参照され
たい)

コロイド分散液中のリガンド、例えばポリリシン-リガンド抱合体としては、平滑筋細胞に結合する物質が好ましい。これらには、平滑筋細胞の膜構造に対する抗体または抗体断片が挙げられ、例えば下記の通りである。

抗体 10 F 3

(Prinseva et al., Exp. Cell Res. 169, 85(1987), American J. Path. 134, 305(1989))または

アクチンに対する抗体

(Desmonliere et al., Comptes Rendus des Seances de la Soc. de Biol et de ses Filiales 182, 391(1988))、または

アンジオテンシンIIレセプターに対する抗体

(Butcher et al., BBRA 196, 1280(1993))、または

成長因子のレセプターに対する抗体

(Mendelsohn, Prog. All. 45, 147(1988), Sato et al., J. Nat. Canc. Inst. 81, 1600(1989), Hynes et al., BBA 1198, 165(1994))、または

° EGFレセプター

(Fan et al., Cancer Res. 53, 4322(1993), Bender et al., Cancer Res. 52, 121(1992), Aboud-Pirak et al., J. Nat. Cancer Inst. 80, 1605(1988), Sato et al., Mol. Biol. Med. 1, 511(1983), Kawamoto et al., PNAS 80, 1337(1983)) または

° PDGFレセプター (Yu et al., J. Biol. Chem. 269, 10668(1994), Kelly et al., J. Biol. Chem. 266, 8987(1991), Bown-Pope et al., J. Biol. Chem. 257, 5161(1982)) または

° PGFレセプター (Vanhalteswaran et al., J. Cell Biol. 115, 418(1991), Zhan et al., J. Biol. Chem. 269, 20221(1994)) または

° エンドセリンAレセプターに対する抗体。

ネズミモノクローナルは、人体に適用される形態で用いるのが好ましい。人体への適用は、Winter et al., (Nature 349, 293(1991)) および Hoogenbooms et al., (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19(1993))によって記載された方法

で行われる。抗体断片は、先行技術に従って、例えばWinter(Nature 349, 293(1991))、Hoogenbooms et al., (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19(1993))

、Giol(Mol. Immunol. 28, 1379(1991))およびHuston et al., (Int. Rev. Immunol. 10, 195(1993))によって記載された方法で調製される。

更に、リガンドとしては、平滑筋細胞上の膜構造または膜レセプターに結合する総ての活性物質が挙げられる(Pusztai et al., J. Pathol. 169, 191(1993), Harris, Current Opin. Biotechnol. 2, 260(1991)の総説)。例えば、これらの物質としては、成長因子、またはそれらの断片またはそれらの部分配列であって、平滑筋細胞によって発現されるレセプターに結合するもの、例えば下記のようなものが挙げられる。

P D G F

(Westermarck et al., Cancer Res. 51, 5087(1991), Ponten et al., J. Invest. Dermatol. 102, 304(1994))

E G F

(Modjtahedi et al., Int. J. Oncol. 4, 277(1994), Carpenter et al., J. Biol. Chem. 265, 7709(1990))

T G F β

(.Segarini, BBA 1155, 269(1993))

T G F α

(Salomon et al., Cancer Cells 2, 389(1990))

F G F

(Burgess et al., Annu. Rev. Biochem. 58, 575(1989))

エンドセリンA

(Oreilly et al., J. Cardiovasc. Pharm. 22, 18(1993))。

4.5. 平滑筋細胞に対する活性化化合物の調製

本発明による活性化化合物の調製を、下記の例によって更に詳細に説明する。

a) キメラプロモーターミオゲニンプロモーターCDE-CHR-Inrの

構築

ヒトミオゲニンプロモーター (Salmin et al., J. Cell Biol. 115, 905 (1991))によって公表されたDNA配列の位置 $\leq -210 \sim \geq +54$)を、その3'末端で、ヒトcdc25C遺伝子のCDE-CHR-Inrモジュール (Lucibello et al., EMBO J., 14, 132 (1995))によって公表された配列の位置 $\leq -20 \sim \geq +121$)の5'末端に連結する(第6図を参照されたい)。連結は、当業者に知られておりかつ市販されている酵素を用いて行われる。また、ミオゲニンプロモーター配列の各種の断片が用いられる(第6図を参照されたい)。従って、ミオゲニンプロモーターのTATAボックスを含むDNA配列を用いる。しかしながら、プロモーター配列位置 $\leq -210 \sim \geq -40$ も、同様に用いることができる(第6図を参照されたい)。

b) 活性化化合物の中心成分におけるプラスミドの構築

このようにして調製したキメラミオゲニンプロモーターモジュール転写制御単位を、その3'末端で、ヒト β -グルクロニダーゼの完全コード領域を含むDNAの5'末端に連結する (Oshima et al., PNAS USA 84, 684 (1987))によって公表された配列のDNA位置 $\leq 27 \sim \geq 1982$) (第6図を参照されたい)。

このDNAは、分泌に必要なシグナル配列をも含んでいる(22個のN-末端アミノ酸)。細胞分泌を促進するため、このシグナル配列は、免疫グロブリンのシグナル配列(位置 $\leq 63 \sim \geq 107$; Riechmann et al., Nature 332, 323(1988))によって置換するのが好ましい(第7図)。このようにして調製した転写制御単位およびヒト β -グルクロニダーゼに対するDNAをpUC19/19またはBluescript由来のプラスミドベクターにクローニングし、これを直接またはコロイド分散液系でイ

ン・ビボでの投与に用いることができる。或いは、キメラ遺伝子を、ウイルスベクターまたは他の好適なベクターに移して、注射することができる。

c) β -グルクロニダーゼ並びに組織プラスミノーゲン活性化物質に対する遺伝子を含むプラスミドの構築

2)の方法で調製したミオゲニンリプレッサーモジュール β -グルクロニダーゼ要素を、その3'末端で、ポリオウイルスの「内部リボソームエントリ-部位」のcDNA(5' UTR要素の位置 $\leq 140 \sim \geq 630$, Pettier and Sonenberg, Nature 334, 320(1988))の5'末端に連結する。次に、この3'末端に、組織プラスミノ-ゲン活性化物質のDNA(位置 $\leq 85 \sim \geq 1753$, Pennica et al., Nature 301, 214 (1983))の5'末端を連結する。全構築物を、次にpuc18/19またはBluescript由来のプラスミドベクターにクローニングして、これを直接またはコロイド分散液系でイン・ビボでの投与に用いることができる。或いは、キメラ遺伝子をウイルスベクターまたは他の好適なベクターに移して、注射することができる(第8図)。

5. 血栓の抑制のための活性化化合物

5.1. 血栓の抑制のための活性化配列の選択

本発明の意味で用いられる活性化配列は、好ましくは平滑筋細胞、活性化された内皮細胞、活性化されたマクロファージまたは活性化されたリンパ球で検出可能なタンパク質をコードする遺伝子由来の遺伝子制御配列または要素である。

a) 平滑筋細胞

平滑筋細胞中の遺伝子に対する活性化配列の例は、既に4.1.で述べられている。

b) 活性化内皮細胞

特に、活性化内皮細胞中で形成されるタンパク質の例は、Burrows et al. (Plarmac. Therp. 64, 155(1994)) およびPlate et al. (Brain Pathol. 4, 207(1994))によって記載されている。特に、内皮細胞で高度に存在するこれらのタンパク質としては、例えば

脳に特異的な内皮グルコース-1-輸送体

脳の内皮細胞は、この輸送体の極めて高度の発現によって識別され、D-グルコースの脳中への経内皮輸送を行う(Gerhart et al., J. Neurosci. Res

22, 464(1989))。プロモーター配列は、Murakami et al. (J. Biol. Chem. 267, 9300(1992))によって記載された。

エンドグリン

エンドグリンは、TGF β の非シグナル伝達レセプターであると思われる (Gougos et al., J. Biol. Chem. 265, 8361(1990); Cheifetz, J. Biol. Chem. 267, 19027(1992), Moren et al., BBRC 189, 356(1992))。 (1993))。これは正常な内皮中に少量存在するが増殖内皮で多量に発現する (Westphal et al., J. Invest. Derm. 100, 27(1993), Burrows et al., Pharmac. Ther. 64, 155(1994))。プロモーター配列は、Bellon et al., (Eur. J. Immunol. 23, 2340(1993))およびGe et al. (Gene 138, 201(1994))によって記載された。

VEGFレセプター

2種類のレセプターが識別されている (Plate et al., Int. J. Cancer 59, 520(1994)):

* VEGFレセプター-1 (flt-1)

(de Vries et al., Science 255, 989(1992))

細胞質部分にfms-様チロシンキナーゼを含む)、および

* VEGFレセプター-2 (flk-1, KDR)

(Terman et al., BBRC 187, 1579(1992))

(細胞質部分にチロシンキナーゼを含む)。

これらのレセプターはいずれも、内皮細胞にほぼ単独で見いだされる (Senger et al., Cancer Metast. Rev. 12, 303(1993))。

他の内皮特異性レセプターチロシンキナーゼ

* tll-1またはtll-2

(Partanen et al., Mol. Cell Biol. 12, 1698(1992), Schnuerch and Risau, Development 119, 957(1993), Dumont et al., Oncogene 7, 1471(1992))

* B61レセプター (Eckレセプター)

(Bartley et al., Nature 368, 558(1994), Pandey et al., Science 268, 567(1995), van der Geer et al., Ann. Rev. Cell Biol. 10, 251(1994))

エンドセリン、特に

・エンドセリンB

(O'Reilly et al., J. Cardiovasc. Pharm. 22, 18(1993), Benatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149(1993), O'Reilly et al., BBRC 193, 834(1993))。

プロモーター配列は、Benatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149(1993)によって記載された。

・エンドセリン-1

(Yanasigawa et al., Nature 332, 411(1988))。

プロモーター配列は、Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4654 (1990) によって記載された。

エンドセリンレセプター、特にエンドセリン-Bレセプター

(Webb et al., Mol. Pharmacol. 47, 730(1995), Haendler et al., J. Cardiovasc. Pharm. 20, 1(1992))。

マンノース-6-リン酸レセプター

(Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225(1994))

プロモーター配列は、Ludwig et al. (Gene 142, 311(1994)), Oshima et al. (J. Biol. Chem. 263, 2553(1988)) および Ohlmann et al. (PNAS USA 84, 5575(1987))によって記載されている。

von Willebrand因子

プロモーター配列は、Jahroudi and Lynch(Mol. Cell. Biol. 14, 999(1994), Ferreira et al., Biochem. J. 293, 641 (1993) および Aird et al., PNAS USA 92, 4567(1995))によって記載された。

IL-1 α , IL-1 β

IL-1は、活性化した内皮細胞によって産生される(Wamer et al., J. Immunol. 139, 1911(1987))。プロモーター配列はHnagen et al., Mol. Carcinog. 2, 68(1986), Tumer et al., J. Immunol. 143, 3556(1989), Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972(1987), Bensi et al., Cell Growth Diff. 1, 491(

1990), Hiscott et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6231 (1993) およびMori et al., Blood 84, 1688(1994)によって記載された。

IL-1 レセプター

プロモーター配列は、Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993) によって記載された。

血管細胞付着分子 (VCAM-1)

内皮細胞でのVCAM-1の発現は、リポ多糖類、TNF- α (Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558(1995))、IL-4 (Iademaro et al., J. Clin. Invest. 95, 264(1995)およびIL-1 (Marni et al., J. Clin. Invest. 92, 1866(1993))によって活性化される。

VCAM-1のプロモーター配列は、Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558(1995), Ahmad et al., J. Biol. Chem. 270, 8976(1995), Neish et al., J. Exp. Med. 176, 1583(1992), Iademaro et al., J. Biol. Chem. 267, 16323(1992)およびCybulsky et al., PNAS USA 88, 7859(1991)によって記載された。

合成活性化配列

天然の内皮特異性プロモーターの代替物として、内皮細胞で優先的または選択的に活性を有する転写因子のオリゴマー化された結合部位からなる合成活性化配列を用いることもできる。

この例は転写因子GATA-2であって、エンドセリン-1遺伝子における結合部位が5'-TTATCT-3'であるものである(Lee et al., Biochem. J. 266, 16188(1991), Dorfmann et al., J. Biol. Chem. 267, 1279(1992)およびWilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854(1990))。

c) 活性化したマクロファージおよび／または活性化したリンパ球

本発明の意味における活性化配列は、免疫反応においてマクロファージおよび／またはリンパ球で多量に形成されるタンパク質に対する遺伝子プロモーター配列を意味するものとも理解すべきである。これらには、例えば下記のものが挙げられる。

- * I L - 1 (Bensi et al., Gene 52, 95(1987), Fibbe et al., Blut 59, 147(1989)),
- * I L - 1 レセプター (Colotta et al., Immunol. Today Immunopath. 72, 9(1994), Ye et al., PNAS USA 90, 2295(1993)),
- * I L - 2 (Jansen et al., CII 39, 207(1994), Ohbe et al., J. Biol. Chem. 270, 7479(1995)),
- * I L - 2 レセプター (Semenzato et al., Int. J. Clin. Lab. Res. 22, 133(1992)),
- * I F N γ (Kirchner, DMW 111, 64(1986), Lehmann et al., J. Immunol. 153, 165(1994)),
- * I L - 4 (Paul, Blood 77, 1859(1991), te Velde et al., Blood 76, 1392(1990)),
- * I L - 4 レセプター (Vallenga et al., Leukemia 7, 1131(1993), Galizzi et al., Int. Immunol. 2, 669(1990)),
- * I L - 3 (Freundl, Int. J. Immunopharm. 14, 421(1992)),
- * I L - 5 (Azuma et al., Nucl. Acid Res. 14, 9149(1986), Yokota et al., PNAS 84, 7388(1987)),
- * I L - 6 (Brack et al., Int. J. Clin. Lab. Res. 22, 143(1992)),
- * L I F (Metcalf, Int. J. Cell Clon. 9, 95(1991), Samal, BBA 1260, 27(1995)),
- * I L - 7 (Joshi et al., 21, 681(1991)),
- * I L - 10 (Benjamin et al., Leuk. Lymph. 12, 205(1994), Fluchiger et al., J. Exp. Med. 179, 91(1994)),
- * I L - 11 (Yang et al., Biofactors 4, 15(1992)),
- * I L - 12 (Kiniwa et al., J. Clin. Invest. 90, 262(1992), Gatelay, Cancer Invest. 11, 500(1993)),
- * I L - 13 (Punnonen et al., PNAS 90, 3730(1993)), Muzio et al.,

Blood 83, 1738(1994)),

* GM-CSF (Metcalf, Cancer 15, 2185(1990)),

* GM-CSF レセプター (Nakagawa et al., J. Biol. Chem. 269, 10905 (1994)),

* Integrin $\beta 2$ タンパク質のような付着タンパク質 (Nueda et al., J. Biol. Chem. 268, 19305(1993)).

これらのタンパク質のプロモーター配列は、下記のように記載された。

* IL-1 レセプター

(Ye et al., PNAS USA90, 2295(1993)),

* IL-1 α

(Hangen et al., Mol. Carbinog. 2, 68(1986), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556(1989), Mori et al., Blood 84, 1688(1994)),

* IL-1 β

(Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972(1987), Bensi et al., Cell Growth Diff. 1, 491(1990), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556(1989), Hiscott et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6231(1993)),

* IL-2

(Fujita et al., Cell 46, 401(1986), Hama et al., J. Exp. Med. 181, 1217(1995), Kant et al., Lymph. Rec. Interact. 179(1989), Kamps et al., Mol. Res. Cell. Biol. 10, 5464(1990), Williams et al., J. Immunol. 141, 662(1988), Brunvand, FASEB J. 6, A998(1992), Matsui et al., Lymphokines 12, 1(1985), Tanaguchi et al., Nature 302, 305(1983)),

* IL-2 レセプター

(Ohbo et al., J. Biol. Chem. 270, 7479(1995), Shibuya et al., Nuc

l. Acids Res. 18, 3697(1990), Lin et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6201(1993), Semenzato et al., Int. J. Clin. Lab. Res. 22,133(1992)),

* IFN γ

(Ye et al., J. Biol. Chem. 269, 25728(1994)),

* I L - 4

(Rooney et al., EMBO J. 13, 625(1994), Hama et al., J. Exp. Med. 181, 1217(1995), Li-Weber et al., J. Immunol. 153, 4122(1994), 148, 1913(1992), Min et al., J. Immunol. 148, 1913(1992), Abe et al., PNAS 89, 2864(1992)),

* I L - 4 レセプター

(Beckmann ら, Chem. Immunol. 51, 107(1992), Ohara ら, PNAS 85, 8221(1988)),

* I L - 3

(Mathey-Prevot et al., PNAS USA 87, 5046(1990), Cameron et al., Blood 83, 2851(1994), Arai et al., Lymphokine Res. 9, 551(1990)),

* I L - 3 レセプター (α サブユニット)

(Miyajima et al., Blood 85, 1246(1995), Rapaport et al., Gene 137, 333(1993), Kosugi et al., BBRC 208, 360(1995)),

* I L - 3 レセプター (β サブユニット)

(Gorman et al., J. Biol. Chem. 267, 15842(1992), Kitamura et al., Cell 66, 1165(1991), Hayashida et al., PNAS USA 87, 9655(1990)),

* I L - 5

(Lee et al., J. Allerg. Clin. Immunol. 94, 594(1994), Kauhansky et al., J. Immunol. 152, 1812(1994), Staynov et al., PNAS USA 92, 3606(1995)),

* I L - 6

(Lu et al., J. Biol. Chem. 270, 9748(1995), Gruss et al., Blood 80, 2563(1992), Ray et al., PNAS 85, 6701(1988), Droogmans et al., DNA-Sequence 3, 115(1992), Mori et al., Blood 84, 2904(1994), Liberman et al., Mol. Cell. Biol. 10, 2327(1990), Ishiki et al., Mol. Cell. Biol. 10, 2757(1990)),

* I L - 7

(Pleiman et al., Mol. Cell. Biol. 11, 3052(1991), Lapton et al., J. Immunol. 144, 3592(1990)),

・ I L - 8

(Chang et al., J. Biol. Chem. 269, 25277(1994), Sprenger et al., J. Immunol. 153, 2534(1994)),

・ I L - 1 0

(Kim et al., J. Immunol. 148, 3618(1992), Platzer et al., DNA Sequence 4, 399(1994), Kube et al., Cytokine 7, 1(1995)),

・ I L - 1 1

(Yang et al., J. Biol. Chem. 269, 32732(1994)),

・ G M - C S F

(Nimer et al., Mol. Cell. Biol. 10, 6084(1990), Staynov et al., PNAS USA 92, 3606 J(B1995), Koyano-Nakayama et al., Int. Immunol. 5, 345(1993), Ye et al., Nucl. Acids Res. 22, 5672(1994))

・ G M - C S F レセプター (α -鎖)

(Nakagawa et al., J. Biol. Chem. 269, 10905(1994))

・ マクロファージコロニー刺激因子 (M - C S F) レセプター

(Yue et al., Mol. Cell. Biol. 13, 3191(1993), Zhang et al., Mol. Cell. Biol. 14, 373(1994)),

・ I および II 型 マクロファージスカベンジャーレセプター

(Moulton et al., Mol. Cell. Biol. 14, 4408(1994)),

・ I L - 1 3

(Staynov et al., PNAS USA 92, 3606(1995))

・ L I F

(Gough et al., Ciba Found. Symp. 167, 24(1992), Stahl et al., Cytokine 5, 386(1993))

・ インターフェロン制御因子 1 であって、そのプロモーターが I L - 6 並びに I F N γ または β によって刺激されるもの

(Harrock et al., EMBO J. 13, 1942(1994))

° I F N γ 反応性プロモーター

(Lamb et al., Blood 83, 2063(1994))

° I F N γ

(Hardy et al., PNAS 82, 8173(1985))

° M A C - 1

(Dziennis et al., Blood 85, 319(1995), Bauer et al., Hum. Gene Ther. 5, 709(1994), Hickstein et al., PNAS USA 89, 2105(1992)),

° L F A - 1 α

(Nueda et al., J. Biol. Chem. 268, 19305(1993), Aguta et al., Blood 79, 602(1992), Cornwell et al., PNAS USA 90, 4221(1993)),

° p 1 5 0, 9 5

(Noti et al., DNA and Cell Biol. 11, 123(1992), Lopezcabrera et al., J. Biol. Chem. 268, 1187(1993)).

5.2. 特に、血栓の抑制のための活性物質の選択

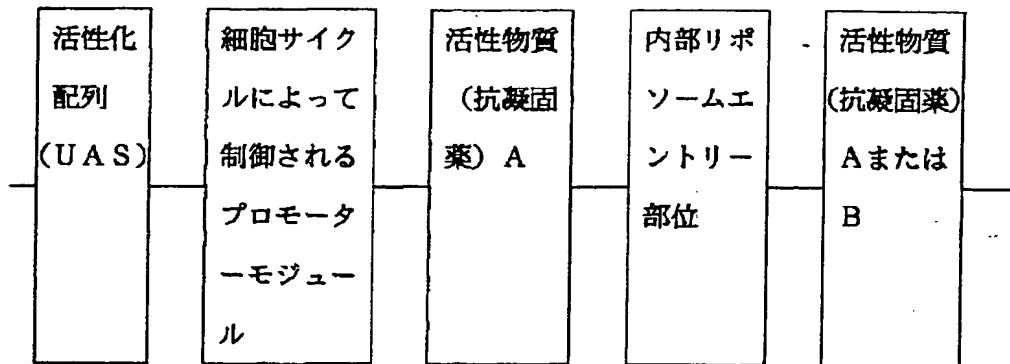
本発明における活性物質としての、直接または間接的に血小板凝集または血栓因子を抑制し、またはフィブリン溶解を促進するタンパク質に対するDNA配列。

この種の活性物質は、抗凝固薬として記載されている。抗凝固薬としては、例えばプラスミノゲン活性化物質(PA)、すなわち組織PA(tPA)またはウロキナーゼ様PA(uPA)、またはタンパク質C、抗トロンビン-III、C-1Sインヒビター、 α 1-抗トリプシン、組織因子経路インヒビター(TFPI)、またはヒルジンに対する遺伝子が用いられる。これらの抗凝固薬に対するDNA配列は、既に4.3.節で記載されている。

5.3. 血栓の抑制のための2個の同一または異なる活性物質の組合せ

本発明は、活性化合物であって、2個の同一の抗凝固薬物質(A, A)または2個の異なる抗凝固薬物質(A, B)のDNA配列の組合せが含まれているものにも関する。これらのDNA配列の発現には、「内部リボソームエントリー部位

」(IRES)のcDNAを制御要素として挿入するのが好ましい。



この種のIRESは、例えばMontford and Smith (TIG 11, 179(1995), Kaufmann et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485(1991), Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293(1992), Dirks et al., Gene 128, 247(1993), Pelletier and Sonenberg, Nature 334, 320(1988), および Sugimoto et al., BioTechn. 12, 694 (1994) によって記載された。

従って、ポリオウイルスのIRES配列のcDNA (5' UTRの位置≤140～≥630(Pelletier and Sonenberg, Nature 334, 320 (1988))を用いて、

抗血栓物質A (3' 末端) のDNAと抗血栓物質B (5' 末端) のDNAとを連結することができる。

この種の2個の同一または異なる遺伝子の組み合わせにより、選択した抗血栓物質の相加効果 (同一遺伝子) または相乗効果が起こる。

5.4. 血栓の抑制のためのリガンドの選択

例えばコロイド分散液でポリリシン-リガンド抱合体を含むウイルスまたは非ウイルスベクターに対するリガンドとしては、平滑筋細胞または増殖内皮細胞、または活性化したマクロファージおよび/またはリンパ球の細胞表面に結合する物質が好ましい。

a) 平滑筋細胞のリガンド

平滑筋細胞に結合するリガンドの例は、既に4.4.節で記載されている。

b) 活性化した内皮細胞のリガンド

本発明の意味では、これらとしては、例えばBurrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155(1994), Hughes et al. (Cancer Res. 49, 6214 (1989) およびMaruyama et al. (PNAS USA 87, 5744(1990))によって記載されているような内皮細胞の膜構造に対する抗体または抗体断片が挙げられる。特に、これらとしては、VEGFレセプターに対する抗体が挙げられる。

ネズミのモノクローナル抗体は、人体に適用される形態で用いるのが好ましい。人体への適用は、4.4.節に示した方法で行われる。抗体断片は、例えば4.4.節に記載した方法で調製する。

リガンドとしては、内皮細胞上の膜構造または膜レセプターに結合する総ての活性化化合物も挙げられる。例えば、これらの化合物としては、末端位 [I a c u n a] に更にマンノースを含む物質、IL-1または成長因子ま

たはその断片またはそれらの部分配列であって、例えばPDGF、bFGF、VEGF、TGF β のような内皮細胞によって発現されるレセプターに結合するものが挙げられる(Pusztain et al., J. Pathol. 169, 191(1993))。

更に、これらの化合物としては、活性化したおよび／または増殖する内皮細胞に結合する付着分子も挙げられる。この種の付着分子、例えばSLex、LFA-1、MAC-1、LECAM-1またはVLA-4は、既に記載されている(Augustin-Voss et al., J. Cell Biol. 119, 483(1992), Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175(1990), Honn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353(1992)の総説)。

c) 活性化したマクロファージおよび／または活性化したリンパ球のリガンド

本発明において、リガンドとしては、免疫細胞の表面に特異的に結合する物質も挙げられる。これらの物質としては、例えばPowelson et al., Biotech. Adv. 11, 725 (1993) によって記載されているような免疫細胞の膜構造に対する抗体または抗体断片が挙げられる。

更に、これらのリガンドとしては、免疫細胞のFc γ -または μ -レセプターにそれらの不変ドメインで結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体または抗体断片も挙げられる。

ここではまた、ネズミのモノクローナル抗体は、人体に適用される形態で用いるのが好ましく(4.4.節を参照されたい)、断片は、例えば4.4.節に引用した方法論を用いて調製する。

また、リガンドとしては、免疫細胞の表面の膜レセプターに結合する総ての物質が挙げられる。例えば、これらの物質としては、成長因子、例えばサイトカイン、EGF、TGF、FGFまたはPDGF、またはその断片、またはこの種の細胞によって発現されるレセプターに結合するものの部分配列が挙げられる。

5.5. 血栓の抑制のための活性化合物の調製

本発明による活性化合物の調製を、下記の例によって更に詳細に説明する。

a) キメラプロモーターエンドセリンICDE-CHR-Inrの構築

ヒトエンドセリン-1プロモーター(位置 $\leq -170 \sim \geq -10$, Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854(1990)) またはTATAボックスによって短縮した変異体(位置 $\leq -170 \sim \geq -40$)を、その3'末端でヒトcdc

25C遺伝子(Lucibello et al., EMBO J., 14, 132(1995))のCDE-CHR-Inrモジュール(位置 $\leq -20 \sim \geq +121$)の5'末端に連結する。連結

は、当業者に知られておりかつ市販されている酵素によって行う。

b) 活性化合物の中心成分にキメラプロモーターエンドセリン-1-CDE-CHR-Inrを含むプラスミノーゲンの構築

上記のキメラエンドセリン-1プロモーターモジュール転写単位を、その3'末端で、組織プラスミノーゲン活性化物質の完全コード領域を含むDNAの5'末端に連結する(位置 $\leq 85 \sim \geq 1753$, Penica et al., Nature 301, 214(1983))。このDNAは、分泌に要するシグナル配列も含んでいる。転写制御単位および組織プラスミノーゲン活性化物質のDNAを、pUC19/19またはBluescript由来のプラスミドベクターにクローニングし、これを直接またはコロイド分散液系でイン・ビボでの投与に用いることができ

る。或いは、キメラ遺伝子を、ウイルスベクターまたは他の好適なベクターに移して、注射することができる。

c) キメラプロモーターミオゲニンCDE-CHR-Inrの構築

ヒトミオゲニンプロモーター (Salmin et al., J. Cell Biol. 115, 905 (1991))によって公表されたDNA配列の位置 $\leq -210 \sim \geq +54$)を、その3'末端で、ヒトcdc25C遺伝子のCDE-CHR-Inrモジュールの5'末端に連結する (Lucibelloら, EMBO J. 14, 132(1995))に

よって公表された配列の位置 $\leq -20 \sim \geq +121$)。この連結は、当業

者に知られておりかつ市販されている酵素を用いて行われる。また、ミオゲニンプロモーター配列の各種の断片が用いられる (第10図を参照されたい)。従って、ミオゲニンプロモーターのTATAボックスを含むDN

A配列が用いられる。しかしながら、プロモーター配列 $\leq -210 \sim \geq -40$ も同様に用いることができる。

d) 活性化化合物の中心成分にキメラプロモーターミオゲニンを含むプラスミドの構築

この方法で調製したキメラミオゲニンプロモーターモジュール転写制御単位を、その3'末端で、組織プラスミノゲン活性化物質の完全コード領域を含むDNAの5'末端に連結する (第10図を参照されたい)。このDNAは、分泌に必要なシグナル配列をも含んでいる。転写制御単位および組織プラスミノゲン活性化物質のDNAを、pUC18/19またはBluescript由来のプラスミドベクターにクローニングして、これを直接またはコロイド分散液系でイン・ビボでの投与に用いることができる。或いは、キメラ遺伝子をウイルスベクターまたは他の好適なベクターに移して、注射することができる。

e) 活性物質に対する2個の遺伝子を含むプラスミドの構築

c)に記載したミオゲニンCDE-CHR-Inr転写単位を、その3'

末端で、組織因子経路インヒビター (TFPI、位置 $\leq 133 \sim \geq 957$;

Wun et al., J. Biol. Chem. 263, 6001 (1988) または位置 $\leq 382 \sim$

≥ 1297 ; Girard et al., Thromb. Res. 55, 37 (1989))のDNAの5

′末端に連結する。連結は、当業者に知られておりかつ市販されている酵素を用いて行われる。

TFPIのDNAの3′末端を、内部リボソーム入口部位のcDNAの

5′末端に連結し (位置 $\leq 140 \sim \geq 630$; Pelletier およびSonnenbe

rg, Nature 334, 320(1988))、この3′末端を、組織プラスミノゲン活性化物質のDNAの5′末端に独占的に連結する (第11図を参照されたい)。この方法で調製したこの活性化合物を、pUC18/19またはBluescript由来のプラスミドベクターにクローニングして、これを直接またはコロイド分散液系でイン・ビボでの投与に用いることができる。或いは、キメラ遺伝子をウイルスベクターまたは他の好適なベクターに移して、注射することができる。

6. 平滑筋細胞および/または血栓に対する活性化合物の作用

局所または全身、好ましくは静脈内または動脈内投与の後、本発明に記載の活性化合物は、血管 (特に内皮層) の傷害または損傷により、また適宜血管容積の内膜中に移動した後、直接接近し得る平滑筋細胞に、独占的にではないにしても支配的になる。

組織特異性活性化配列および細胞サイクルによって制御されるリプレッサーモジュールの組み合わせにより、細胞サイクルインヒビターは分割する平滑筋細胞で主としてまたは独占的に活性化されるようになる。

突然変異した細胞サイクルインヒビターの本発明に従って用いることによって、その一層長期間の増殖抑制効果が保証される。

局所的 (例えば、組織、体腔または組織間隙中)、または全身的、好ましくは静脈内または動脈内投与の後、本発明に記載の活性化合物は、独占的にではないにしても主として、平滑筋細胞、活性化したリンパ球または活性化したマク

ロファージが抗血栓物質を発現し、従ってこれは血栓の起源の部位に放出されるようにすることができる。

活性化化合物は、その細胞特異性並びに細胞サイクル特異性により、高度の安全性が確保されるので、これを高投与量でかつ必要ならば、数日または数

週間の間隔で繰り返し投与して、平滑筋細胞の増殖によって引き起こされる血管の閉塞の予防または治療、および／または血栓症の予防および／または治療を行うことができる。

第1図～第11図の説明

第1図：

イン・ビボで見いだされたタンパク質結合部位を有する *c d c 2 5 C* プロモーター領域のヌクレオチド配列（ゲノム DMS フットプリント法；○（黒丸）：完全な構成上の保護；○（白丸）：部分的な構成上の保護；*（星印）：細胞サイクルによって制御された G_1 に特異的な保護）。CBS：構成結合部位；CDE：細胞サイクル依存性要素。灰色に下塗した領域は、Ycボックス（NF-Y結合部位）を示している。開始部位は、黒四角形で示す。

第2図：

c d c の突然変異による G_0 における特異的な *c d c 2 5 C* プロモーターの抑制解除。

第3図：

CDEによる *c d c 2 5 C* エンハンサーの制御を模式的に表したもの。

第4図：

CDEによるSV40エンハンサーの G_0/G_1 特異的抑制。

第5図：

c d c 2 5 C、サイクリンAおよび *c d c 2* プロモーターにおけるCDE-CHR領域および5' Ycボックスでの相同性。

第6図：

ヒトミオゲニン（Myf-4）プロモーター、CDEおよびCHRリプレッサー要素を有する3' 融合プロモーターモジュール、およびエフェクターとしての

ヒト β -グルクロニダーゼのDNA (完全コード領域、位置 $\leq 27 \sim \geq 1982$)

の各種部分からなるキメラ構築物(90shima et al., PNAS USA84, 685(1987))。

位置の詳細は、ミオゲニン遺伝子についてのSalminen et al., J. Cell Biol. 115, 905(1991)の詳細またはcdc25CについてのLucibello et al., EMBO J. 14, 132(1995)によって用いられた系に関するものである。

第7図：

β -グルクロニダーゼの相同シグナル配列の(ヒト免疫グロブリンの)非相同シグナル配列による置換。免疫グロブリン(HuVHcAMP)のシグナル配列(MGWSCIIILFLVATAT)の位置の詳細は、Riechmann et al., Nature 332, 323(1988)に関するものである。

代替： β -グルクロニダーゼの細胞外分泌を一層良好にするためのIgのシグナルペプチドの挿入。(B)を参照されたい。

第8図：

ヒトミオゲニン(Myf-4)プロモーター、CDEおよびCHRリプレッサー要素およびヒト β -グルクロニダーゼのDNAを含む3'-融合プロモーターモジュール、制御ヌクレオチド配列としての内部リボソームエントリー部位、および組織プラスミノゲン活性化物質に対するDNAの様々な部分からなるキメラ構築物。位置の詳細は、ミオゲニンについてはSalminen et al., J. Cell Biol. 115, 905(1991)に関し、CDE/CHR-Inr要素についてはLucibello et al., EMBO J. 14, 132(1995)に関し、 β -グルクロニダーゼについてはOshima et al., PNAS USA 84, 685(1987)に関し、免疫グロブリンのシグナル配列についてはRiechmann et al., Nature 332, 323(1988)に関し、ポリオウイルスの内部リボソーム入口部位についてはPelletier and Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)に関し、ヒト組織プラスミノゲン活性化物質についてはPennica et al., Nature 301, 214(1983)に関する。

第9図：

ヒトエンドセリン-1プロモーター、CDEおよびCHRリプレッサー要素を含む3'-融合プロモーターモジュール、およびエフェクターとしてヒト組織プ

ラスミノゲン活性化物質に対するのDNA（完全コード領域、Pennica et al., Nature 301, 214(1983))の様々な部分からなるキメラ構築物。位置の詳細は、エンドセリン-1遺伝子についてはWilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 48545(1990)の詳細またはcdc25CについてはLucibello et al., EMBO J. 14, 132(1995)によって用いられる系に関する。

第10図：

ヒトミオゲニン(Myf-4)プロモーター、CDEおよびCHRリプレッサー要素を含む3'-融合プロモーターモジュール、およびエフェクターとしてのヒト組織プラスミノゲン活性化物質に対するDNA（完全コード領域）の様々な部分からなるキメラ構築物。位置の詳細は、ミオゲニン遺伝子についてはSalminen et al., J. Cell Biol. 115, 905(1991)に関し、またはcdc25CについてはLucibello et al., EMBO J. 14, 132(1995)によって用いられる系に関し、組織プラスミノゲン活性化物質についてはPennica et al., Nature 301, 214(1983)の詳細に関する。

第11図

2個のエフェクター遺伝子を有するキメラ構築物。

組織因子経路インヒビターについての位置の詳細は、

*) Wun et al., J. Biol. Chem. 263, 6001 (1988).

**) Girard et al., Thromb. Res. 55, 37(1989)

に関し、

内部リボソームエンタリー部位(IRES)-cDNAについては、Pelletier and Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)に基づいている。

第1表： cdc25C、サイクリンAおよびcdc2の細胞サイクル制御転写におけるCDEおよびCHRの役割

第1表

	G_0	成長	因子
wt			
c d c 25 C	0.8	13.1	17.5
サイクリンA	0.7	27.1	41.7
c d c 2	1.0	41.2	41.2
mCDE (-13)			
c d c 25 C	7.6	11.6	1.5
サイクリンA	13.4	23.9	1.8
c d c 2	11.3	33.9	3.0
mCHR (-6/-3)			
c d c 25 C	14.4	21.0	1.5
サイクリンA	15.5	28.3	1.8
c d c 2	18.6	38.6	2.1

H I H 3 T 3細胞での遷移トランスフェクションの結果は、RLUs / 1000として表す。mCDE：突然変異したCDE（位置：-13：G→T）；mCHR：突然変異したCHR位置：-6～-3）

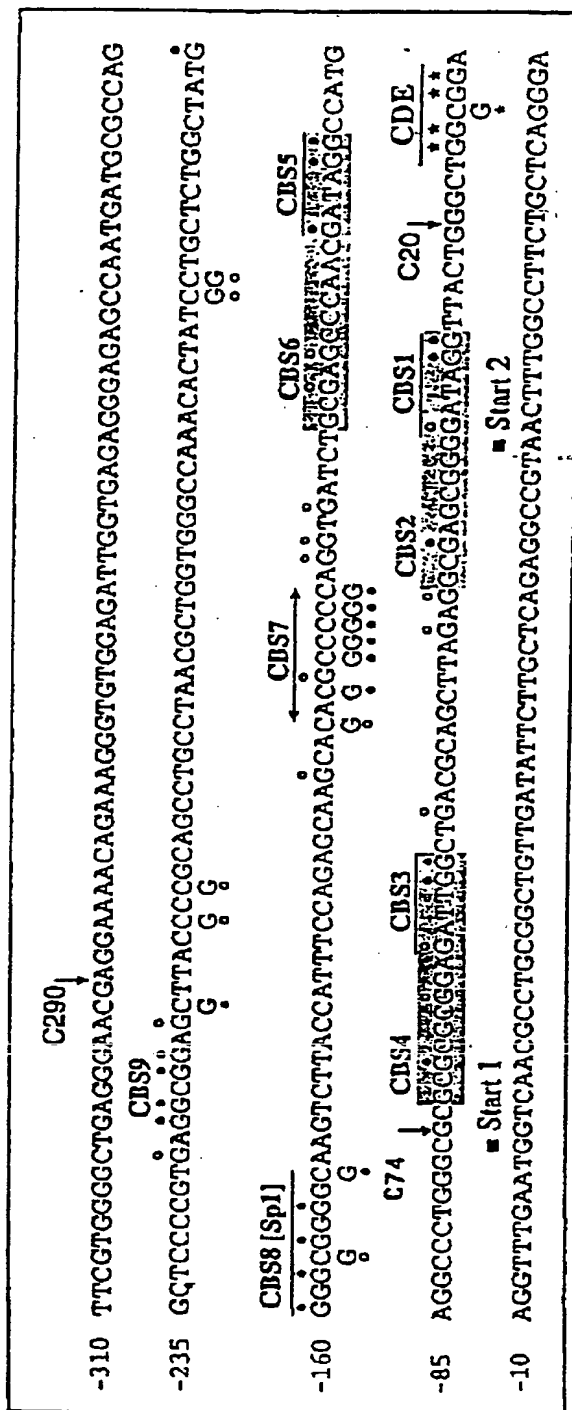


FIG. 1

【図2】

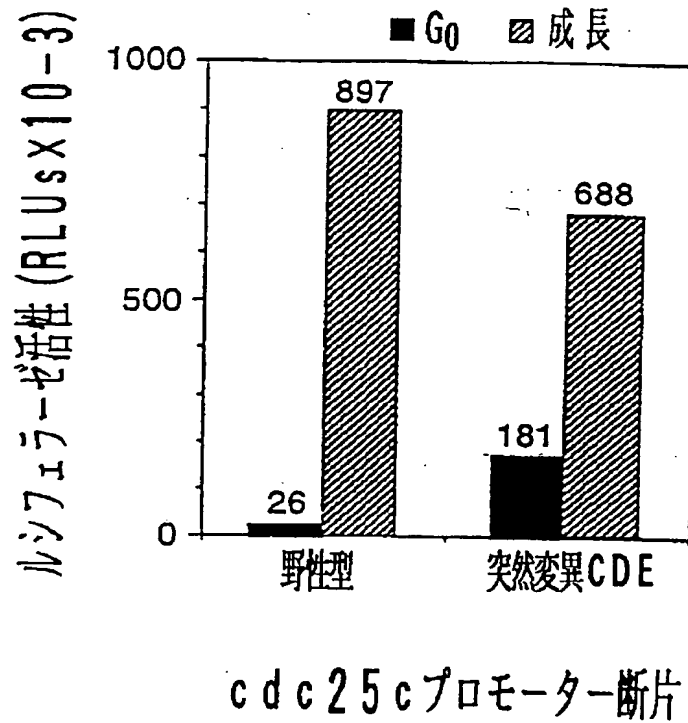


FIG. 2

【図3】

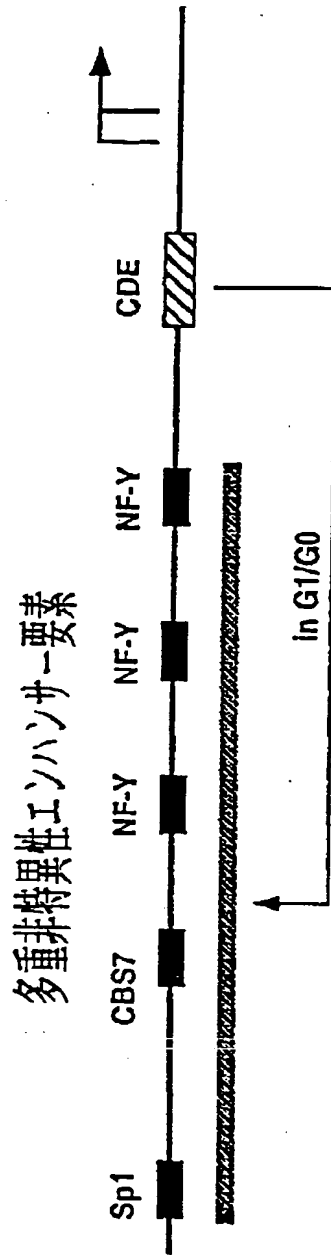


FIG. 3

【図4】

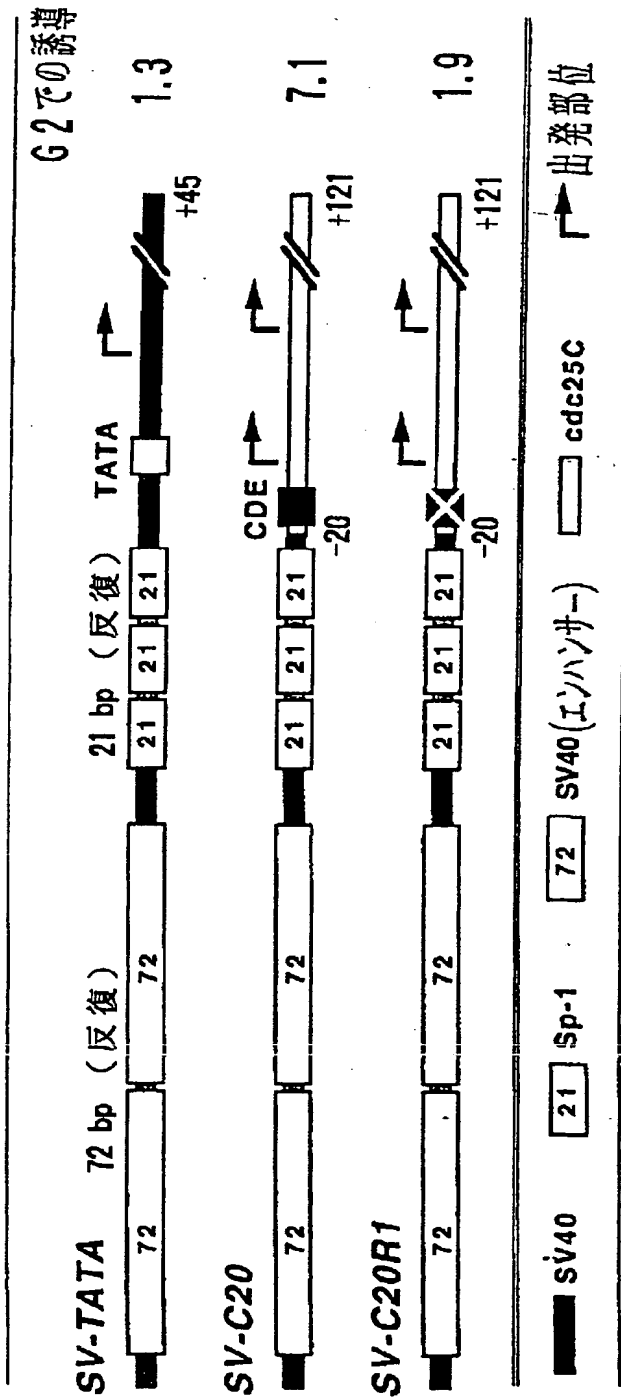


FIG.4

【图5】

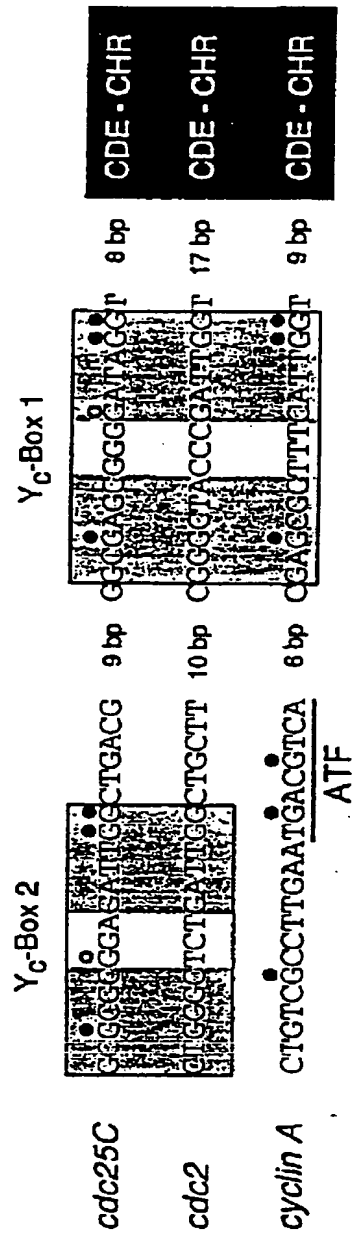


FIG. 5

【図6】

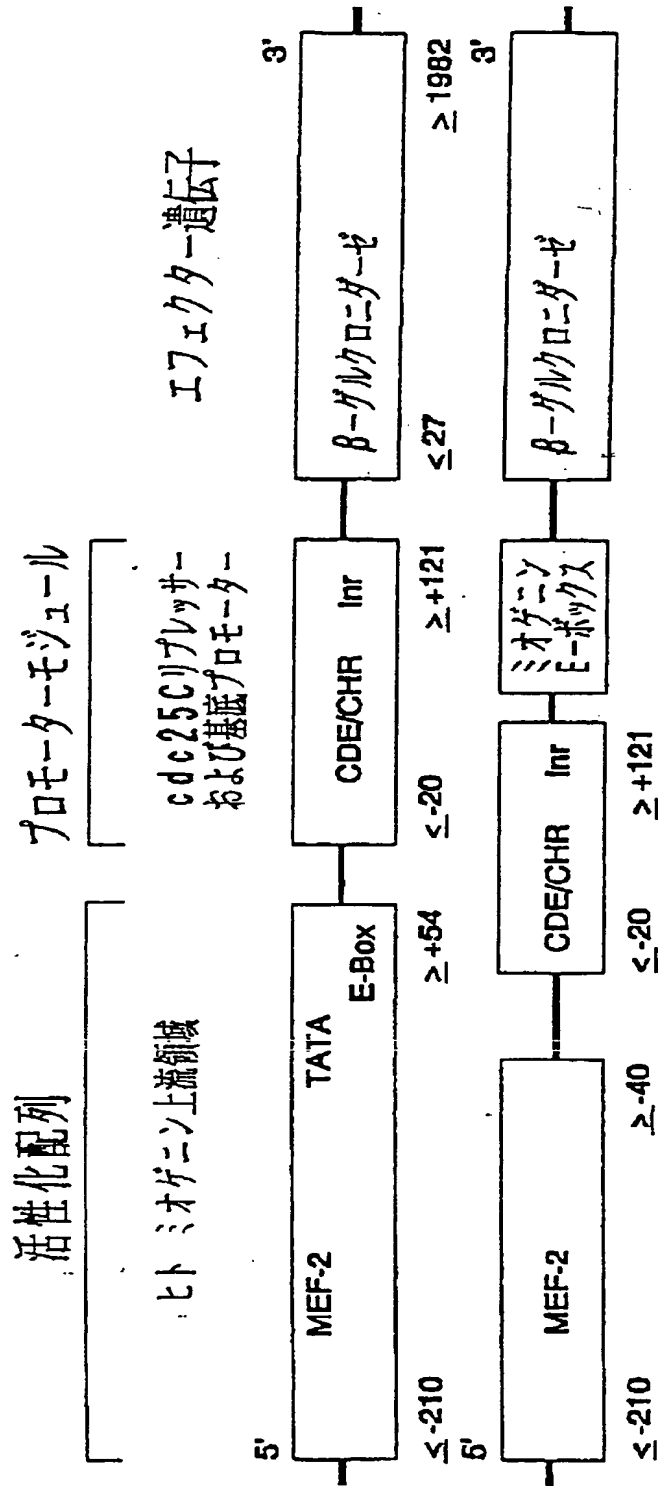


FIG. 6

【図 7】

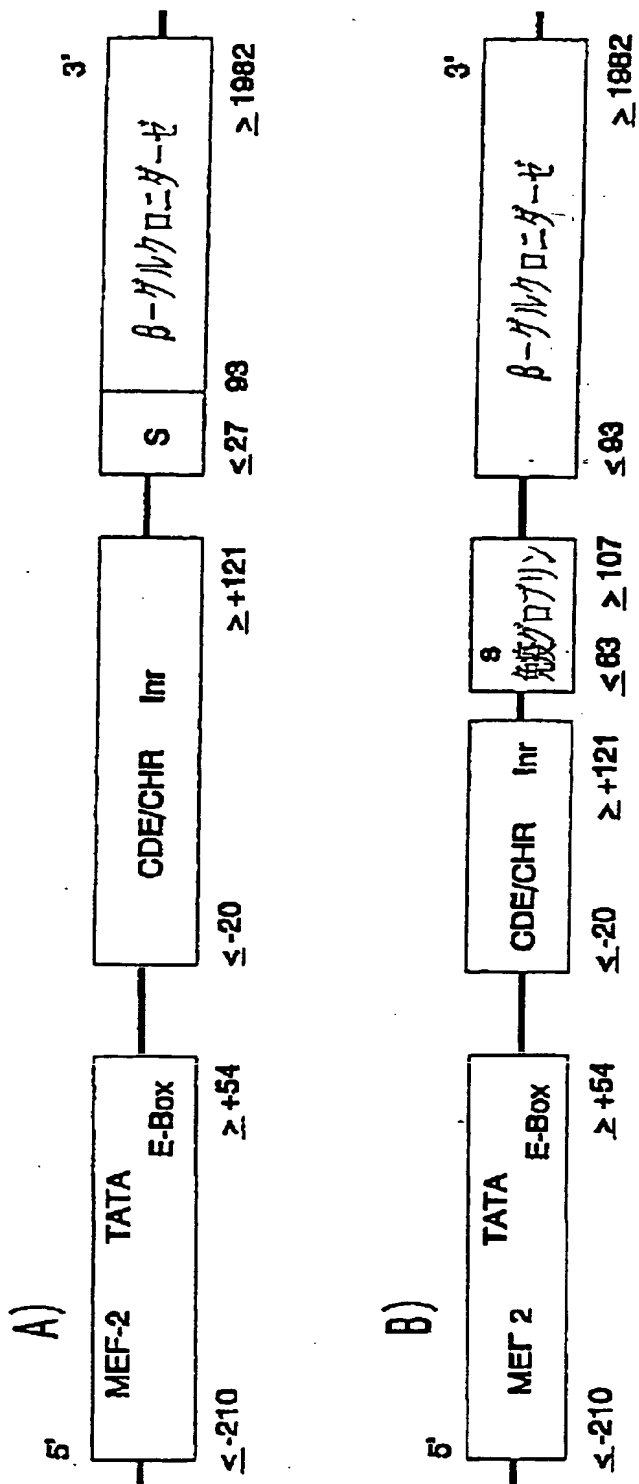


FIG. 7

【図8】

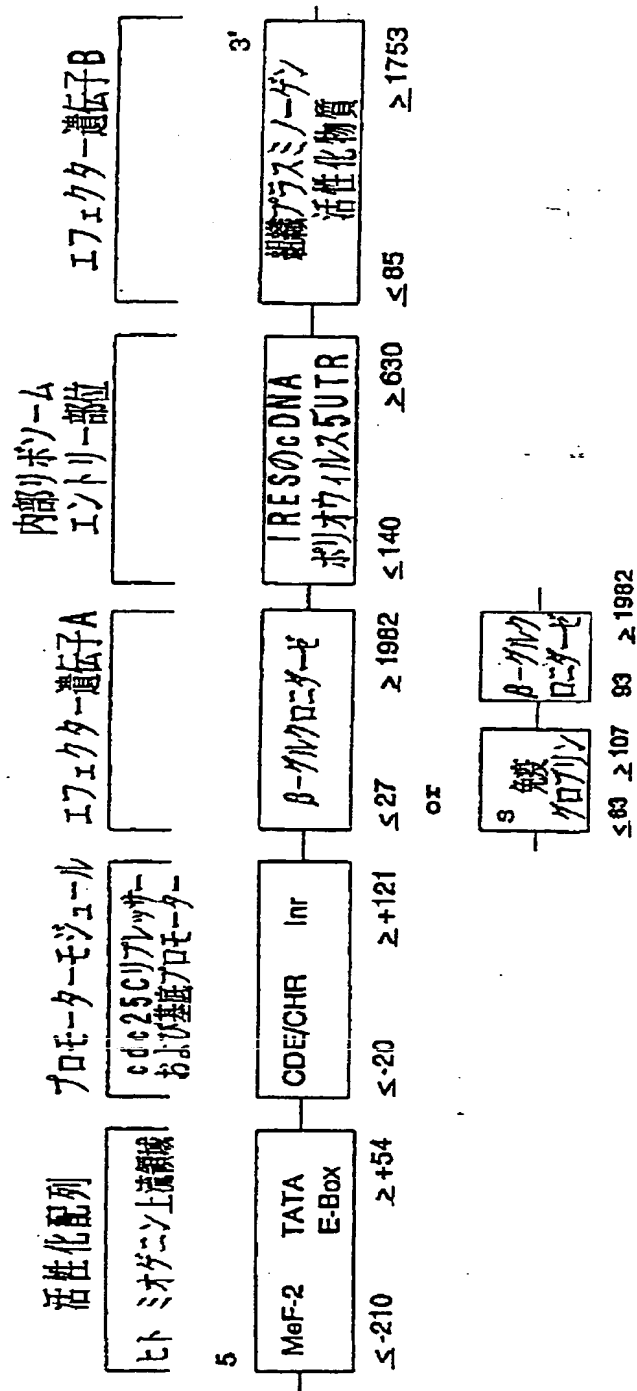


FIG. 8

【図9】

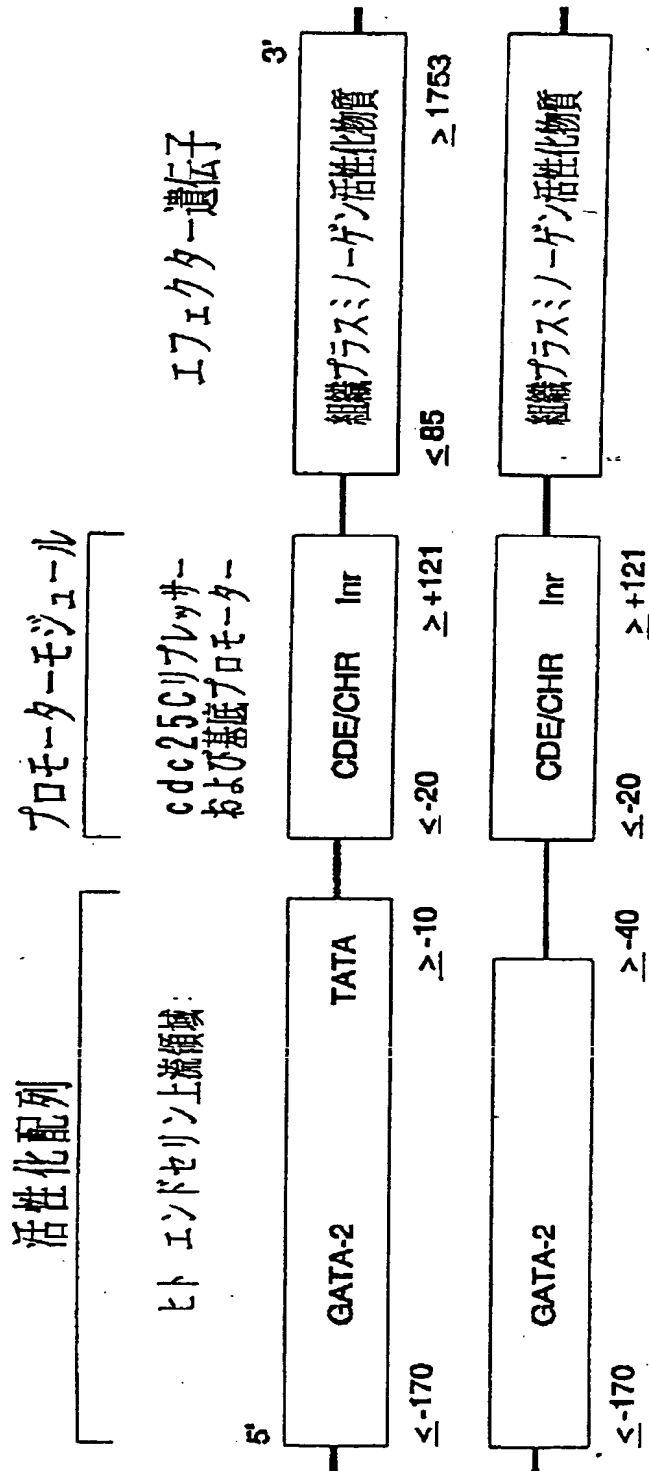


FIG. 9

活性化配列		プロモーターモジュール		エフェクター遺伝子	
5'	ヒト ミオゲニン上流領域	cdc25Cリプレッサー および基底プロモーター	3'		
MEF-2	TATA E-Box	CDE/CHR Inr	組織プラスミノゲン活性化物質	≤ -210	≥ +1753
MEF-2		CDE/CHR Inr	組織プラスミノゲン活性化物質	≤ -20	≥ +121
MEF-2		ミオゲニン E-ボックス		≥ +54	≥ +121
MEF-2				≤ -210	≥ +40

FIG. 10

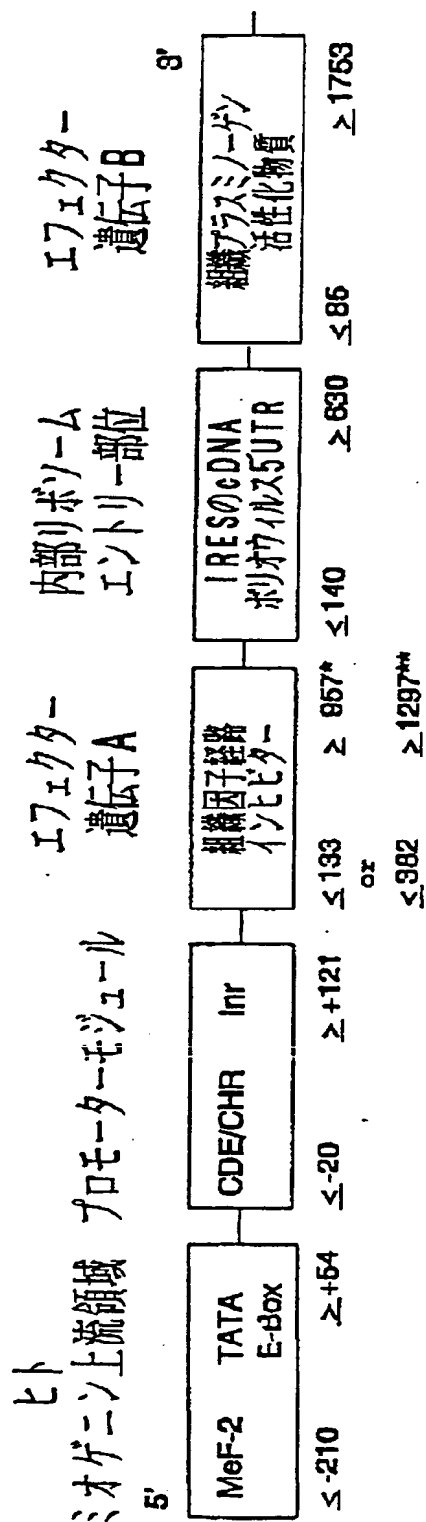


FIG. 11

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1996年5月24日

【補正内容】

請求の範囲

1. 血管系の疾病の予防または治療のための活性化合物であって、活性化合物配列と、細胞サイクルによって制御されるプロモーターモジュールと、細胞サイクルインヒビターおよび／または血栓インヒビターである活性物質のDNA配列とからなるDNA構築物を含んでなる、活性化合物。

2. プロモーターモジュールがCDE-CHR-Inr要素を有し、かつcdc25Cプロモーター領域（ヌクレオチド配列：GGCTGGCGGAAGGTTTGAATGGTCAACGCCTGCGGCTGTTGATATTCTTG）の位置 $\leq -20 \sim \geq +30$ を含んでなるものであり、ここで、CDEが細胞

サイクル依存性要素（ヌクレオチド配列：TGGCGG）からなり、CHRが細胞サイクル遺伝子相同領域（ヌクレオチド配列：GTTTGAA）からなり、Inrが開始部位（位置+1）および開始に重要な隣接配列からなるものである、請求の範囲第1項に記載の活性化合物。

3. 平滑筋細胞で形成される転写因子によって制御される活性化合物配列（プロモーターまたはエンハンサー配列）を含んでなる、請求の範囲第1項または第2項に記載の活性化合物。

4. 活性化合物配列として、CMVエンハンサー、CMVプロモーターまたはSV40プロモーター、または

トロポミオシン、 α -アクチン、 α -ミオシン、PDGFレセプター、FGFレセプター、MRF-4、アセチルコリンレセプター、ホスホフルクトキナーゼA、ホスホグリセレートムターゼ、トロポニンC、ミオゲニン、エンドセリンレセプターまたはデスミン、または

活性化合物配列として筋肉特異性HLHタンパク質（Eボックス）またはGATA-4についての結合部位の多重コピー、または

VEGFについてのプロモーター配列、またはVEGFについてのエンハンサー配列、またはc-Srcまたはv-SrcについてのDNA配列であって、VEGF遺伝子を制御するものを含んでなる、請求の範囲第3項に記載の活性化化合物。

5. 活性物質のDNA配列が、

網膜芽細胞腫タンパク質p110またはp107、およびp130タンパク質であり、または

p53タンパク質、または

p21タンパク質、P16タンパク質または別の「サイクリン依存性キナーゼ(cdk)」インヒビター、または

GADD45タンパク質、または

bakタンパク質、または

細胞成長抑制または細胞毒性タンパク質、または

細胞成長抑制剤の前駆体を開裂して細胞成長抑制剤を形成する酵素である細胞サイクリンインヒビターをコードするものである、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

6. 網膜芽細胞腫タンパク質(pRb/p110)が、246、350、601、605、780、786、787、800および804位のアミノ酸の置換によりリン酸化することができず、しかしながら例えばアミノ酸Thr-246、Ser-601、Ser-605、Ser-780、Ser-786、Ser-787およびSer-800がAlaで置換されたもの、アミノ酸Thr-350がArgで置換されたものおよびSer-804がGluで置換されたものように、大型のT抗原との結合活性を喪失せず、または

p107タンパク質が、pRb/p110と同様の方法で突然変異され、または

p130タンパク質が、pRb/p110と同様の方法で突然変異されたものである、

請求の範囲第5項に記載の活性化化合物。

7. タンパク質 p 5 3 の DNA 配列が、セリン 3 9 2 を除去することによって C 末端が短縮されたものである、請求の範囲第 5 項に記載の活性化合物。

8. 細胞サイクルインヒビターがペルフォリン、グランチーム、TNF α または TNF β である、請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれか 1 項に記載の活性化合物。

9. 細胞サイクルインヒビターが酵素であり、この酵素が単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ、ニトロレダクターゼ、 β -グルクロニダーゼ（特に、ヒト、植物または細菌性 β -グルクロニダーゼ）、カルボキシペプチダーゼ、（好ましくは、シュドモナス由来のもの）、ラクタマーゼ（好ましくは、*Bacillus cereus* 由来のもの）、ピログルタメートアミノペプチダーゼ、D-アミノペプチダーゼ、オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ホスファターゼ、ヒドロキシニトリルリアーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼまたはグリコシダーゼであり、この酵素についてのシグナル配列が相同性であり、または細胞分泌を良好にするには、非相同性であるものである、請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれか 1 項に記載の活性化合物。

10. リソソーム保存が酵素の DNA 配列の点突然変異によって減少し、細胞外分泌が増加された、請求の範囲第 9 項に記載の活性化合物。

11. 数個の同一または異なる抗腫瘍物質の DNA 配列を含み、それぞれの場合に 2 個の DNA 配列が内部リボソーム入口部位の DNA 配列によって互いに接続されてなる、請求の範囲第 1 ~ 10 項のいずれか 1 項に記載の活性化合物。

12. 活性物質の DNA 配列が血栓インヒビターをコードするものである、請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれか 1 項に記載の活性化合物。

13. 細胞サイクルインヒビターの DNA 配列が血栓インヒビターの DNA 配列によって補足され、これらの 2 種類の配列を内部リボソームエンタリー部位の DNA 配列によって互いに接続されてなる、請求の範囲第 1 ~ 10 項のいずれか 1 項に記載の活性化合物。

14. 血栓インヒビターの DNA 配列が tPA、uPA、tPA および uPA のハイブリッド分子、タンパク質 C、抗トロンビン III、TFPI、C-イン

ヒビター、 $\alpha 1$ -抗トリプシンまたはヒルジンをコードするものである、請求の範囲第12項に記載の活性化合物。

15. 増殖する内皮細胞で形成される転写因子によって制御される活性化合物配列（プロモーターまたはエンハンサー配列）を含んでなる、請求の範囲第1項または第2項に記載の活性化合物。

16. 内皮グルコース-1輸送体、エンドグリン、VEGFレセプター-1または-2、レセプターチロシンキナーゼ*t i l*-1または*t i l*-2、B61レセプター、B61リガンド、エンドセリン、特にエンドセリン-B、-1、マンノース-6-リン酸レセプター、IL-1 α またはIL-1 β 、IL-1レセプター、VCAM-1、von Willebrand因子、または

GATA-2のような内皮細胞で優先的または選択的に活性を有する転写因子のオリゴマー化した結合部位であって5'-TTATCT-3'である結合部位からの合成活性化合物配列

を含んでなる、請求の範囲第15項に記載の活性化合物。

17. マクロファージまたはリンパ球の活性化で特定の程度まで形成される転写因子によって制御される活性化合物配列（プロモーターまたはエンハンサー配列）を含んでなる、請求の範囲第1項または第2項に記載の活性化合物。

18. サイトカインまたはそのレセプター、特にインターロイキン（II）-1 α またはII-1 β 、II-1レセプター、II-2、II-2レセプター、インターフェロン γ 、II-3、II-3レセプター、II-4、II-4レセ

プター、II-5、II-6、II-7、II-8、II-9、II-10、II-11、II-12、II-13、M-CSFレセプター、マクロファージスカベンジャーI型またはII型レセプター、インターフェロン制御因子1、IFN- γ 反応性プロモーター、IFN- γ 、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、GM-CSFレセプター、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、付着タンパク質、例えばLFA-1Mac-1またはp150/95、または白血病抑制因子（LIF）についてのプロモーター配列を含んでなる、

請求の範囲第17項に記載の活性化合物。

19. 活性物質についてのDNA配列が血栓インヒビターをコードするものである、請求の範囲第15～18項のいずれか1項に記載の活性化合物。

20. 血栓インヒビターのDNA配列が組織プラスミノゲン活性化物質(tPA)、ウロキナーゼ(uPA)、tPAおよびuPAのハイブリッド、タンパク質C、抗トロンビンIII、組織因子経路インヒビター、C-1インヒビター、 α 1-抗トリプシンまたはヒルジンをコードするものである、請求の範囲第19項に記載の活性化合物。

21. 複数の同一または異なる血栓インヒビターのDNA配列を含み、2個のDNA配列が互いに内部リボソームエントリー部位のDNA配列によって接続されてなる、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載の活性化合物。

22. ベクターに挿入された、請求の範囲第1～21項のいずれか1項に記載の活性化合物。

23. ベクターがウイルスである、請求の範囲第22項に記載の活性化合物。

24. ウイルスがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、単純ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルスである、請求の範囲第22項に記載の活性化合物。

25. プラスミドに挿入された、請求の範囲第1～24項のいずれか1項に

記載の活性化合物。

26. コロイド分散液系で調製される、請求の範囲第22～25項のいずれか1項に記載の活性化合物。

27. コロイド分散液系がリポソームである、請求の範囲第26項に記載の活性化合物。

28. コロイド分散液系がポリリシンリガンドである、請求の範囲第26項に記載の活性化合物。

29. 平滑筋細胞、活性化した内皮細胞、活性化したマクロファージ、または活性化したリンパ球の膜構造に結合するリガンドで補足された、請求の範囲第

22～28項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

30. リガンドが、

ポリクローン性またはモノクローン性抗体、またはその抗体断片であって、その可変ドメインによって、平滑筋細胞、活性化した内皮細胞、活性化したマクロファージまたは活性化したリンパ球の膜構造に結合し、または

サイトカインまたは成長因子、またはその断片または部分配列であって、平滑筋細胞、活性化した内皮細胞、活性化したマクロファージまたは活性化したリンパ球上のレセプターに結合するものであるか、または

SLeX、LFA-1、MAC-1、LECAM-1またはVLA-4のような付着分子である、

請求の範囲第22項に記載の活性化化合物。

31. 内皮細胞の膜構造が、マンノースのレセプター、IL-1または成長因子、例えばPDGF、FGF、VEGF、TGF β である、請求の範囲第30項に記載の活性化化合物。

32. 膜構造がアクチン、アンギオテンシンIIレセプター、EGFレセプター、PDGFレセプター、FGFレセプター、またはエンドセリンレセプターで

ある、請求の範囲第30項に記載の活性化化合物。

33. 膜構造が、サイトカイン、成長因子、インターフェロン、ケモカインのレセプター、特に幹細胞因子、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、GM-CSF、M-CSF、G-CSFまたはTNF α のレセプターである、請求の範囲第32項に記載の活性化化合物。

34. 筋肉、結合組織、肝臓、腎臓、脾臓、肺または皮膚のような組織への注射、皮膚または粘膜への局所適用、関節、胸膜腔、腹膜腔またはクモ膜下腔のような体腔への注射、または動脈または静脈注射のような血管系への注射のための製剤とされた、請求の範囲第1～33項のいずれか1項に記載の活性化化合物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 95/03368
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/85 A61K48/00 C12N15/86		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 13807 (GEORGETOWN UNIVERSITY) 22 July 1993 see the whole document	1,3,9, 15-18,22
X	WO,A,93 10135 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 27 May 1993 see page 18, line 21 - page 20, line 28	1,5,15, 18
A	BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 87, no. Supplement 1, 2 - 5 June 1994 page 124 F.EHLERT ET AL. 'Cell cycle-regulated transcription of the human cdc25C gene is controlled by a novel regulatory element' see abstract 483	2
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 January 1996		Date of mailing of the international search report 19. 01. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5111 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 95/03368
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, A, 94 29469 (VICAL INCORPORATED) 22 December 1994 see examples 2-7	1, 4, 18, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/03368

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A-9313807	22-07-93	AU-B- 3429993	03-08-93
WO-A-9310135	27-05-93	AU-B- 3063692	15-06-93
WO-A-9429469	22-12-94	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/22		A 6 1 K 37/02	ACB
38/46	ADS	37/54	ADS
38/55	ABR	37/64	ABR
47/48		37/66	
48/00		37/24	
//(C 1 2 N 15/09	ZNA		
C 1 2 R 1:91)			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, C Z, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, T J, TT, UA, US, UZ, VN

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEIST
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM



WO 9606938A1

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/85, A61K 48/00, C12N 15/86		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/06938
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	7. März 1996 (07.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03368		(81) Bestimmungsstaaten: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. August 1995 (25.08.95)			
(30) Prioritätsdaten:			
9417366.3	26. August 1994 (26.08.94)	GB	
9506466.3	29. März 1995 (29.03.95)	GB	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Emil-von-Behring-Strasse 76, D-35041 Marburg (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEDLACEK, Hans-Harald [DE/DE]; Sonnenhang 3, D-35041 Marburg (DE). MÜLLER, Rolf [DE/DE]; Poitiersstrasse 8, D-35037 Marburg (DE).			
(54) Title: GENETIC THERAPY OF VASCULAR DISEASES WITH A CELL-SPECIFIC ACTIVE SUBSTANCE WHICH IS DEPENDENT ON THE CELL CYCLE			
(54) Bezeichnung: GENTHERAPEUTISCHE BEHANDLUNG VON GEFÄSSERKRANKUNGEN DURCH EINEN ZELLSPEZIFISCHEN, ZELLZYKLUSABHÄNGIGEN WIRKSTOFF			
(57) Abstract			
<p>A DNA sequence is disclosed for the genetic therapy of vascular diseases. The essential components of the DNA sequence are the activator sequence, the promoter module and the active substance coding gene. The activator sequence is specifically activated in smooth muscle cells, activated endothelial cells, activated macrophages or activated lymphocytes. Activation is cell cycle-regulated by the promoter module. The active substance represents an inhibitor of the growth of smooth muscle cells and/or coagulation. The disclosed DNA sequence is inserted into a viral or non-viral vector, supplemented with a ligand with affinity for the target cells.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Es wird eine DNA-Sequenz für die Gentherapie von Gefäßerkrankungen beschrieben. Wesentliche Elemente für die DNA-Sequenz sind die Aktivatorsequenz, das Promotormodul und das Gen für die Wirksubstanz. Die Aktivatorsequenz wird zellspezifisch aktiviert in glatten Muskelzellen, aktivierten Endothelzellen, aktivierten Makrophagen oder aktivierten Lymphozyten. Diese Aktivierung wird zellzyklusspezifisch reguliert durch das Promotormodul. Die Wirksubstanz stellt einen Inhibitor für das Wachstum glatter Muskelzellen und/oder für die Gerinnung dar. Die beschriebene DNA-Sequenz wird eingefügt in einen viralen oder nicht-viralen Vektor, ergänzt um einen Liganden mit Affinität für die Zielzelle.</p>			